

**Untersuchungen zur Lokalisation und
Expression der PCE-Dehalogenase
in *Sulfurospirillum multivorans***

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat.

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena
von

Diplom-Biologe Markus John
geboren am 02.02.1978 in Friedrichroda

1. Gutachter

Prof. Dr. G. Diekert

2. Gutachter

Prof. Dr. E. Kothe

3. Gutachter

Prof. Dr. J. R. Andreesen

Tag der mündlichen Prüfung

24.04.2007

Tag der Verteidigung

25.06.2007

INHALT	I
ABKÜRZUNGEN	III
ZUSAMMENFASSUNG	V
1. EINLEITUNG	1
1.1. Chlorierte Verbindungen in der Umwelt	1
1.2. Abbau chlorierter Verbindungen	1
1.3. Organismen mit der Befähigung zur Dehalorespiration	2
1.4. Charakterisierung reduktiver Dehalogenasen	3
1.5. Topologie der Atmungskette	7
1.6. Komponenten der Atmungskette	9
1.7. Regulation der Dehalogenasen	10
1.7.1. Regulation der ortho-Chlorphenol-Dehalogenase von <i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	11
1.7.2. Regulation anderer reduktiver Dehalogenasen	12
1.7.3. Regulation der PCE-Dehalogenase von <i>Sulfurospirillum multivorans</i>	14
1.8. Ziel der Arbeit	14
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Kultivierung von <i>Sulfurospirillum multivorans</i>	16
2.2. Enzymmessungen an ganzen/permeabilisierten Zellen	17
2.3. Immunologische Methoden	18
2.4. Elektronenmikroskopie	21
2.5. Extraktion von Corrinoïden aus Rohextrakt	22
2.6. Analytische Methoden	23
2.7. Molekularbiologische Methoden	24
2.8. Material	29

3. ERGEBNISSE	30
3.1. Lokalisation der PCE-Dehalogenase von <i>S. multivorans</i>	30
3.1.1. Nachweis der PCE-Dehalogenase durch enzymatische Messungen	31
3.1.2. Nachweis der PCE-Dehalogenase mit spezifischen Antikörpern	33
3.1.3. Lokalisation der PCE-Dehalogenase in Gefrierbruchpräparaten nach Immunogoldmarkierung	35
3.2. Nachweis der Expression von PceB	38
3.3. Expression der PCE-Dehalogenase	40
3.3.1. Transkription der PCE-Dehalogenase	42
3.3.2. Vergleich des Corrinoidgehalts PceA-positiver/-negativer Kulturen	43
3.3.3. Induktion der PCE-Dehalogenase in einer PceA-negativen Kultur	45
3.4. Vergleich von PceA-positiven und -negativen Kulturen	47
3.4.1. Unterschiede in der Zellstabilität	47
3.4.2. Unterschiede im Gefrierbruch	51
4. DISKUSSION	53
4.1. Lokalisation der PCE-Dehalogenase von <i>S. multivorans</i>	53
4.2. Nachweis der Expression von PceB	59
4.3. Expression der PCE-Dehalogenase	62
4.4. Vergleich von PceA-positiven und -negativen Kulturen	64
5. SCHLUSSBEMERKUNGEN	70
6. LITERATUR	72
ANHANG	

Abkürzungen

APS	A mmonium p ersulfat
ATP	A denosin t ri p hosfat
<i>cis</i> -DCE	<i>cis</i> - D ichlo r e t hen
CKW	C hlo r kohle n wasserstoff
CIOHPA	3- C hlor-4- H ydroxy p henyl a cet a t
CM	Zytoplasma m embran
CTAB	C etyl t rimethyl a mmonium b romid
Cy	Zytoplasma
DMSO	D imethyl s ulfo x id
DNS	D esoxyribo n ukleinsäure
dNTP	D esoxyribo n ukleotid t ri p hosfat
DTT	1,4- D ithio-D,L- t hreit o l
EDTA	E thylendi a min- T etra a cet a t
EM	e xoplasma t ische Seite der M embran
Fu	F umarat
GFP	G rün- F luoreszierendes- P rotein
GST	G lutathion- S - T ransferase
HEPES	N-(2- H ydroxy e thyl) p iperazin-N'-2- E thansulfonsäure
HPLC	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IBF	I nclusion- B ody- F raktion
IPTG	Isopropyl-1- t hio-β-D- G alactosid
LB-Medium	L uria- B ertani-Medium
LBB	L abeling- B locking- B uffer
LPS	L ipopolysaccharid
MBP	M altose- B indendes- P rotein
n.b.	nicht b estimmt
NBT	p- N itrotetrazolium b lauchlorid
n.v.	nicht v orhanden
OD	o ptische D ichte
OM	äußere M embran
PAGE	P olyacrylamid- G elelektrophorese
PBS(T)-Puffer	P hosphate- B uffered S aline (T ween)-Puffer
PCE	P erchlorethen (= Tetrachlorethen)
PceA	PCE-Dehalogenase
PceA ⁻	Dehalogenase-negativ
PceA ⁺	Dehalogenase-positiv
PEG	P olyethylenglycol
PM	p rotoplasma t ische Seite der M embran
PVDF-Membran	P olyvinylidendi f luorid-Membran
Py	P yruvat
RNS	R ibonukleinsäure
RSA	R inderserum a lbumin
RT	R aum t emperatur
Rt	Retentionszeit

(RT)-PCR	(reverse T ranskription)- P olymerasekettenreaktion
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SK(X)	S ubkultur mit (X) = Anzahl der Subkultivierungen (eine Subkultur ist definiert als 24-Stunden-Kultur)
TAE	T ris- A cetate- E DTA
Tat	T win- A rginin- T ransport
2,4,6-TCP	2,4,6- T richlorphenol
TCE	T richlorethen
TE-Puffer	T ris- E DTA-Puffer
TEM	T ransmissionselektronen m ikroskop
TEMED	N,N,N',N'- T etramethylethylendi a min
TorA	T rimethylamin-N- O xid- R eduktase
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid
U	U nits
ü/N	ü ber N acht
VC	V inyl c hlorid
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Reihe phylogenetisch sehr unterschiedlicher, anaerober Bakterien kann die reduktive Dechlorierung chlorierter Kohlenwasserstoffe in einem Atmungsprozess an die Energiegewinnung durch ATP-Synthese koppeln. Dieser Prozess ist als Dehalorespiration bekannt. Schlüsselenzyme dieser anaeroben Atmung sind die reduktiven Dehalogenasen. Fast alle Enzyme dieser Enzymklasse enthalten Eisen-Schwefel-Zentren sowie ein Corrinoide als Kofaktor. Die Enzyme wurden in den vergangenen 15 Jahren eingehend biochemisch und genetisch charakterisiert. Die Lokalisation der terminalen Enzyme der Dehalorespiration wurde bisher nur mit indirekten Methoden untersucht. Die darauf basierenden unterschiedlichen Modelle für die Dehalorespiration verschiedener Bakterien werden deshalb kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Lokalisation einer reduktiven Dehalogenase erstmals mit direkten Methoden nachgewiesen. Es handelt sich dabei um die Tetrachlorethen-(PCE-)Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans*. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation vom chlorierten Substrat abhängig ist. Nur in Anwesenheit von PCE wurde das Enzym an und über die Membran ins Periplasma transportiert. In Abwesenheit des Substrats lag die Dehalogenase zytoplasmatisch vor. Die "klassische" Methode zum Nachweis der Lokalisation von Enzymen durch die Messung ihrer Aktivitäten an Zellen vor und nach Permeabilisierung mit Detergentien wurde ebenfalls eingesetzt und für das betrachtete Enzymsystem für ungeeignet befunden.

Die PCE-Dehalogenase (PceA) von *S. multivorans* wurde als konstitutives Enzym beschrieben. Im Laufe der Arbeit wurde durch Subkultivierung auf Pyruvat/Fumarat eine Dehalogenase-negative Kultur erhalten. Erst in der 35. Subkultur war die PCE-Dehalogenase sowohl im Westernblot als auch im Enzymtest nicht mehr nachweisbar. Durch RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Transkription des Gens in diesen Zellen herunterreguliert war. Ein Verlust des Gens (*pceA*) durch Subkultivierung ist aufgrund von PCR-Analysen unwahrscheinlich.

Der Corrinoidgehalt der Dehalogenase-positiven und -negativen Zellen wurde miteinander verglichen. Dabei wurde eine Abnahme der Norpseudovitamin-B₁₂-

Synthese um den Faktor 60 in den Dehalogenase-negativen Zellen festgestellt. Dieses Ergebnis führte zu der Schlussfolgerung, dass die Synthese des Kofaktors und die Expression der Dehalogenase funktionell miteinander gekoppelt sind.

In den Zellen ohne exprimierte Dehalogenase konnte erstmals die Induktion des Enzyms durch PCE untersucht werden. Die Induktion von PceA erfolgte erst mehr als 50 Stunden nach Zugabe des Substrats.

Dehalogenase-positive Zellen starben auf Pyruvat/Fumarat-Medium in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von PCE langsam oder sehr schnell ab. Die Absterberate unterschied sich dabei um den Faktor zehn. Diese Zellen zeigten auch im Gefrierbruch ein unterschiedliches Verhalten. Zellen, die mit PCE kultiviert worden waren, brachen hauptsächlich in der Zytoplasmamembran. Im Gegensatz dazu brachen Zellen, die ohne PCE kultiviert worden waren, hauptsächlich in der äußeren Membran. Ein Gefrierbruch in der äußeren Membran ist für Gram-negative Bakterien untypisch. Die Lokalisation der PCE-Dehalogenase scheint einen Einfluss auf die Zellstabilität zu haben. Diese Beobachtung wurde durch das Verhalten von Dehalogenase-negativen Zellen bekräftigt. Diese hatten eine mehr als doppelt so lange stationäre Phase verbunden mit einer um den Faktor vier geringeren Absterberate auf Pyruvat/Fumarat-Medium (ohne PCE) im Vergleich zu Dehalogenase-positiven Zellen. Auch brachen die Zellen ohne exprimierte Dehalogenase im Gefrierbruch hauptsächlich in der Zytoplasmamembran.

Neben den Genen für die reduktiven Dehalogenasen wurde in fast allen Dehalogenase-Operonen ein zweiter offener Leserahmen (*pceB*) mit bisher unbekannter Funktion identifiziert. Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung der abgeleiteten Proteine (PceB) wurde eine Funktion als Membrananker für die Dehalogenasen postuliert. Zur Aufklärung der Funktion von PceB wurden Expressionsanalysen in *E. coli* durchgeführt. In diesem heterologen Expressionssystem wurden die Gene *pceAB* im Verhältnis von ca. 1:1 kotranslatiert. Die Expression von PceA und PceB im gleichen stöchiometrischen Verhältnis unterstützte die Theorie der Membran-ankerfunktion von PceB für die reduktive Dehalogenase. Jedoch konnte aufgrund der Ergebnisse in *E. coli* nicht notwendigerweise auf die Situation in *S. multivorans* geschlossen werden.

1. EINLEITUNG

1.1. Chlorierte Verbindungen in der Umwelt

Entgegen den früheren Annahmen, dass chlorierte Verbindungen rein anthropogenen Ursprungs sind, ist inzwischen bekannt, dass diese Substanzen auch durch natürliche Prozesse gebildet werden. Derzeit sind mehr als 3500 halogenierte Verbindungen rein natürlicher Herkunft beschrieben (Gribble 1998). Sogar die hoch reaktive und toxische Verbindung Vinylchlorid wird in signifikanten Mengen im Boden gebildet (Keppler et al. 2002). Die natürlichen Quellen dieser halogenierten Verbindungen sind neben marinen Organismen, Pflanzen, Bakterien und Insekten auch Wald- und Buschbrände sowie vulkanische Aktivität. Die Mengen an gebildeten halogenierten Verbindungen können sogar die der anthropogenen Produktion übersteigen (Fetzner 1998).

Aufgrund der intensiven Verwendung in der Industrie und der Landwirtschaft sind chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW) in der Umwelt in relativ hohen Konzentrationen vorhanden. Sie sind unter anderem Bestandteile von Lösungsmitteln, Extraktionsmitteln, Schmier- und Farbstoffen und dienen als Ausgangsstoffe für die Herstellung von Pestiziden sowie synthetischer Folien.

Neben Dichlorethan sind Tetrachlorethen (PCE) und Trichlorethen die am weitesten verbreiteten CKWs im Grundwasser. Hier konnten Konzentrationen von bis zu mehreren 100 Mikrogramm pro Liter nachgewiesen werden (Fetzner 1998). Aufgrund ihrer toxischen und karzinogenen Eigenschaften sowie ihrer Persistenz stellen sie eine Gefährdung für die Umwelt und die menschliche Gesundheit dar.

1.2. Abbau chlorierter Verbindungen

Die biologische Dechlorierung von CKWs ist vom Grad der Chlorierung sowie den Umweltbedingungen abhängig. Niederchlorierte CKWs werden recht effizient unter aeroben Bedingungen mikrobiell abgebaut. Dieser Abbau erfolgt allerdings ko-metabolisch meist durch Mono- und Dioxygenasen. Diese Enzyme haben ein großes Substratspektrum und können durch die Bildung der entsprechenden Epoxide chlorierte Substrate ohne Energiegewinn für die Bakterien abbauen. Die Epoxide zerfallen anschließend spontan (Wackett et al. 1989; Zylstra et al. 1989).

PCE hat innerhalb der chlorierten Ethene die höchste Oxidationsstufe und ist unter aeroben Bedingungen nicht abbaubar (Leisinger 1996). Der Abbau kann nur unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen erfolgen. Aufgrund des hohen Standardredoxpotentials von PCE/TCE von +580 mV ist diese Verbindung ein potentieller Elektronenakzeptor unter den genannten Bedingungen. Ähnliches trifft auch für weitere chlorierte aliphatische Verbindungen und Chlorphenole zu (Vogel et al. 1987; Dolfing 2000). Innerhalb der letzten 20 Jahre ist eine immer größer werdende Zahl von anaeroben Bakterien beschrieben worden, die chlorierte Substrate als Elektronenakzeptoren in anaeroben Atmungsketten verwenden können (Holliger et al. 2003; Smidt und de Vos 2004). Dieser Prozess ist mit der Dechlorierung des Elektronenakzeptors sowie der Energiegewinnung über Elektronentransportphosphorylierung verbunden. Deshalb wird diese neuartige anaerobe Atmung auch als Dehalorespiration bezeichnet (Holliger et al. 1998a).

1.3. Organismen mit der Befähigung zur Dehalorespiration

Desulfomonile tiedjei war das erste Bakterium, für das die reduktive Dechlorierung nachgewiesen werden konnte (DeWeerd et al. 1990; Mohn und Tiedje 1990; Dolfing 2000). Seitdem wurden eine Vielzahl von Bakterien isoliert, die verschiedene chlorierte Verbindungen als Elektronenakzeptoren nutzen können (Holliger et al. 1998a, 2003). Dennoch können diese Organismen phylogenetisch nur 4 Gruppen zugeordnet werden: i) Gram-positive mit niedrigem GC-Gehalt (*Desulfitobacterium* spp., *Dehalobacter* spp., *Clostridium bifermentans* DPH1), ii) δ -Proteobacteria (*Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Desulfomonile* spp., *Desulfuromonas* spp., *Desulfovibrio* spp., *Geobacter thiogenes*), iii) ϵ -Proteobacteria (*Sulfurospirillum* spp.) und iv) Chloroflexi (*Dehalococcoides* spp.) (Holliger et al. 2003; Smidt und de Vos 2004).

Die Vielfalt der verwendeten chlorierten Substrate reicht von chlorierten Alkanen und Alkenen über Chlorbenzole bis hin zu Dioxin (Bunge et al. 2003). Bis jetzt sind drei Isolate bekannt (*Dehalobacter restrictus*, *Dehalococcoides ethenogenes* 195, *Dehalococcoides* Stamm CBDB1), die obligat auf Wasserstoff als Elektronendonator und auf chlorierte Substrate als Elektronenakzeptoren angewiesen sind. Diese Organismen können somit als obligat reduktive Dechlorierer bezeichnet werden. Die anderen Organismen zeichnen sich durch eine größere Stoffwechselvielfalt aus. Sie können neben Wasserstoff auch z.B. Formiat, Pyruvat, Ethanol und Lactat als

Elektronendonoren verwenden. Als nicht-chlorierte Elektronenakzeptoren kommen z.B. Fumarat, Nitrat, Sulfit, Sulfat, oder auch Thiosulfat in Frage.

Innerhalb der PCE-dechlorierenden Bakterien ist *Dehalococcoides ethenogenes* 195 das bisher einzig bekannte Bakterium, welches PCE vollständig über Trichlorethen (TCE), *cis*-Dichlorethen (*cis*-DCE) und Vinylchlorid (VC) zu Ethen abbauen kann. Die Dechlorierung von VC zu Ethen ist jedoch in diesem Stamm ein kometabolischer Prozess und nicht mit einer Energiegewinnung verbunden. Neuere Untersuchungen konnten die respirative Dechlorierung von Vinylchlorid zu Ethen in den Stämmen *Dehalococcoides* Stamm VS (Müller et al. 2004) und *Dehalococcoides* Stamm BAV1 (Krajmalnik-Brown et al. 2004) nachweisen. Bei den meisten PCE-dechlorierenden Organismen ist die Dechlorierung nur unvollständig. Beim Abbau von PCE durch *Desulfitobacterium* Stamm PCE1 entsteht als Endprodukt TCE. Die meisten anderen PCE-Dechlorierer haben als Endprodukt *cis*-DCE. Einige Beispiele dafür sind *Dehalobacter restrictus*, *Desulfitobacterium* Stamm PCE-S und TCE1, *Desulfuromonas chloroethenica* TT4B sowie *Sulfurospirillum multivorans*.

Die Vielzahl der bisher isolierten reduktiv dehalogenierenden Bakterien sowie der Nachweis von putativen Genen für reduktive Dehalogenasen unbekannter Bakterien in Bodenproben mit Dechlorierungsaktivität in sauberen und kontaminierten Habitaten legt die Vermutung nahe, dass die natürlich produzierten halogenierten Verbindungen die Entwicklung der reduktiven Dehalogenasen forciert haben (Smidt und de Vos 2004).

1.4. Charakterisierung reduktiver Dehalogenasen

Trotz der Vielfalt der für die reduktive Dechlorierung verwendeten Substrate und auch die weite Verbreitung dieser Fähigkeit im Bakterienreich konnten für die bisher charakterisierten Dehalogenasen viele Gemeinsamkeiten festgestellt werden. In Tabelle 1 sind die Organismen aufgelistet, von denen die Dehalogenase(n) gereinigt und charakterisiert und/oder die sie kodierenden Gene identifiziert worden sind.

Tab. 1 Überblick über die bisher gereinigten und/oder genetisch charakterisierten reduktiven Dehalogenasen.

Organismus	Substrat	End- produkt	Kofaktoren (mol/mol Protein), MW	Operon- struktur	Erklärungen zur Operonstruktur	Induktoren	Lokali- sation	Literatur
<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> Stamm 195	PCE	TCE	Corrinoid* Fe/S n.b. 51 kDa	<i>pceAB</i>		PCE	m ¹ , p ²	Magnuson et al. 1998 Nijenhuis und Zinder 2005
	TCE, <i>cis</i> -DCE, (Vinylchlorid)	Ethen	Corrinoid* 2 (4Fe/4S) [#] 61 kDa	<i>tceAB</i>		TCE	m ¹ , p ²	Magnuson et al. 1998, 2000 Nijenhuis und Zinder 2005
<i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm VS	alle DCE- Isomere, Vinylchlorid	Ethen	Corrinoid n.b. 2 (4Fe/4S) [#] 62 kDa	<i>vcrABC</i>	<i>vrcC</i> = putativer TF der NosR/NirI-Familie	Vinylchlorid, 1,1-DCE	m ¹	He et al. 2003a, 2003b Müller et al. 2004
<i>Dehalococcoides</i> sp. Stamm BAV-1	Vinylchlorid	Ethen	2 (4Fe/4S) [#] 57 kDa [#]	<i>bvcAB</i>		Vinylchlorid	n.b.	Krajmalink-Brown et al. 2004
<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	ClOHPA, <i>ortho</i> -Cl- Phenole	OHPA, (Cl)-Phenole	1 Cobalamin 1 (4Fe/4S) 1 (3Fe/4S) 48 kDa	<i>cprTKZEBACD</i>	<i>cprDE</i> = Chaperone, <i>cprT</i> = Trigger Faktor, <i>cprK</i> = TF (Crp-Fnr-Familie), <i>cprC</i> = putative TR der NosR/NirI-Familie	2-Cl-4-R- Phenole, R = Cl, Br, F, CH ₃ oder CO ₂ H	m ¹	Smidt et al. 2001 Utkin et al. 1994, 1995 van de Pas et al. 1999
<i>Desulfitobacterium hafniense</i> Stamm DCB-2	Cl-OHPA	OHPA	1 Cobalamin 12Fe/13S 47 kDa	n.b.		Cl-OPHA	m ¹	Christiansen et al. 1996, 1998
<i>Desulfitobacterium frappieri</i> PCP-1	2,4,6,-Cl-Phenol	4,6-Cl-Phenol	Corrinoid* Fe/S [#] n.v. 37 kDa	<i>crdA</i>	Sequenz unvollständig	2,4,6,-Cl-Phenol	m ¹	Boyer et al. 2003
	3,5-Cl-Phenol	3-Cl-Phenol	Corrinoid* [#] 2 (Fe/S) [#] 57 kDa	<i>cprA5B5</i>		3,5-Cl-Phenol, temperatur- abhängig	m ¹	Thibodeau et al. 2004

Tab. 1 Überblick über die bisher gereinigten und/oder genetisch charakterisierten reduktiven Dehalogenasen (Fortsetzung).

Organismus	Substrat	End- produkt	Kofaktoren (mol/mol Protein), MW	Operon- struktur	Erklärungen zur Operonstruktur	Induktoren	Lokali- sation	Literatur
<i>Desulfitobacterium</i> sp. Stamm PCE1	CIOHPA	OHPA	Corrinoid* 48 kDa	n.b.		CIOHPA	m ¹	Gerritse et al. 1996 van de Pas et al. 2001
	PCE	TCE	Corrinoid* 44 kDa	n.b.		PCE	m ¹	van de Pas et al. 2001
<i>Desulfitobacterium</i> <i>hafniense</i> Stamm Y51	PCE, TCE	cis-DCE	Corrinoid* Fe/S [#] 58 kDa	<i>pceABCT</i>	<i>pceC</i> = putativer, membranaler TF, <i>pceT</i> = Trigger Faktor	PCE, TCE	s ¹ , c ⁴ + p ⁴	Furukawa et al. 2005 Futagami et al. 2006 Maillard et al. 2005 Suyama et al. 2001, 2002
<i>Desulfitobacterium</i> <i>hafniense</i> Stamm TCE1	PCE, TCE	cis-DCE	Corrinoid n.b. 59 kDa	<i>pceABCT</i>	<i>pceC</i> = putative TR der NosR/NirI-Familie, <i>pceT</i> = Trigger Faktor	PCE	m ¹	Maillard et al. 2005 van de Pas et al. 2001
<i>Desulfitobacterium</i> <i>hafniense</i> Stamm PCE-S	PCE, TCE	cis-DCE	1 Cobalamin 8Fe/8S 65 kDa	<i>pceAB</i>		konstitutiv	s ¹ , c ^{2,3}	Maillard et al. 2005 Miller et al. 1997, 1998
<i>Desulfitobacterium</i> Stamm KBC1	PCE	TCE	Fe/S [#] 51 kDa [#]	<i>prdAB + prdK</i>	<i>prdK</i> = möglicher TF (CAP-Familie), Transkription durch PCE Induziert	PCE	n.b.	Tsakagoshi et al. 2006
<i>Dehalobacter restrictus</i>	PCE, TCE	cis-DCE	1 Cobalamin 2 (4Fe/4S) 60 kDa	<i>pceABCT</i>	<i>pceC</i> = putative TR der NosR/NirI-Familie, <i>pceT</i> = Trigger Faktor	konstitutiv	m ¹ , c ²	Holliger et al. 1993, 1998b Maillard et al. 2003, 2005 Schumacher und Holliger 1996 Schumacher et al. 1997 Wild et al. 1996

Tab. 1 Überblick über die bisher gereinigten und/oder genetisch charakterisierten reduktiven Dehalogenasen (Fortsetzung).

Organismus	Substrat	End- produkt	Kofaktoren (mol/mol Protein), MW	Operon- struktur	Erklärungen zur Operonstruktur	Induktoren	Lokali- sation	Literatur
<i>Clostridium bifermentans</i> DPH-1	PCE, TCE	<i>cis</i> -DCE	Corrinoid* Fe/S [#] n.v. 2 x 35 kDa	<i>pceC</i>	<i>pceC</i> = Gen für PCE- Dehalogenase	PCE	s ¹	Okeke et al. 2001
<i>Sulfurospirillum</i> <i>multivorans</i> Stamm K	PCE, TCE	<i>cis</i> -DCE	1 Norpseu- do- vitamin-B ₁₂ 8Fe/8S 58 kDa	<i>pceAB</i>		konstitutiv	s ¹ , c ^{2,3}	Miller et al. 1997 Neumann et al. 1995, 1996, 1998 Scholz-Muramatsu et al. 1995
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	3-Cl-Benzoat	Benzoat	Häm, Fe/S n.b. 64 & 37 kDa	n.b.		3-Cl-Benzoat, Benzamide, Bezylalkohol	m ¹ , c ²	Cole et al. 1995 DeWeerd et al. 1990 Louie und Mohn 1999 Ni et al. 1995

1: Isolierung der reduktiven Dehalogenase aus der Membranfraktion (m) oder aus der löslichen Fraktion (s)

2: Lokalisationsstudien an ganzen/permeabilisierten Zellen mit Methylviologen als Elektronendonator: zytoplasmatisch (c), periplasmatisch (p)

3: Lokalisationsstudien an Zellen, die ohne chlorierte Substrate kultiviert wurden

4: Lokalisationsstudien mit spezifischem Antikörper im Westernblot

*: Corrinoid wird aufgrund der reversiblen Hemmung der Dechlorierung durch Propyliodid vermutet

[#]: abgeleitet von der DNS-Sequenz aufgrund von Bindemotiven

n.b.: nicht bestimmt; n.v.: nicht vorhanden

PCE: Perchlorethen = Tetrachlorethen; TCE: Trichlorethen; DCE: Dichlorethen; ClOHPA: 3-Chlor-4-Hydroxyphenylacetat

OHPA: 4-Hydroxyphenylacetat; TF: Transkriptionsfaktor; TR: Transkriptionsregulator

Die meisten Dehalogenasen sind Monomere mit einer molaren Masse zwischen 47 und 65 kDa. Als Kofaktoren enthalten sie ein Corrinoid sowie zwei Eisen-Schwefel-Zentren. Im N-Terminus der Proteinsequenz haben sie eine charakteristische Aminosäuresequenz (RRxFx(L)K). Diese Sequenz ist als Tat (**T**win-**A**rginin-**T**ransport)-Motiv bekannt (Berks et al. 2000, 2005). Proteine mit diesem Sequenzmotiv werden von dem Tat-Transportsystem an und über die Membran ins Periplasma exportiert.

Als bisher einzige Ausnahme galt die Dehalogenase von *Desulfomonile tiedjei*. Diese ist ein Heterodimer, wobei die kleine Untereinheit ein Häm anstelle eines Corrinoids trägt. Eisen-Schwefel-Zentren sind in dieser Dehalogenase scheinbar nicht vorhanden (Ni et al. 1995). Jüngere Befunde der gereinigten und charakterisierten Corrinoid-abhängigen PCE- und 2,4,6-Trichlorphenol (TCP)-Dehalogenasen von *Clostridium bifermentans* DPH-1 (Okeke et al. 2001) und *Desulfitobacterium hafniense* PCP-1 (Boyer et al. 2003) weisen darauf hin, dass diese Dehalogenasen ebenfalls keine Eisen-Schwefel-Zentren enthalten. Aufgrund der fehlenden Bindemotive für Eisen-Schwefel-Cluster zeigen diese beiden Enzyme keine Sequenzhomologien zu anderen reduktiven Dehalogenasen. Zusätzlich fehlt ihnen auch die Signalsequenz für den Tat-abhängigen Transport. Die membrangebundene 2,4,6-TCP-Dehalogenase von *Desulfitobacterium hafniense* PCP-1 ist wahrscheinlich ein nur 33 kDa großes Protein (Boyer et al. 2003). Die PCE-Dehalogenase (35 kDa) von *Clostridium bifermentans* DPH-1 ist vermutlich als Homodimer aktiv (Okeke et al. 2001). Diese Unterschiede in Enzymen mit gleicher bzw. ähnlicher Funktion deuten darauf hin, dass sich reduktive Dehalogenasen eventuell auf verschiedenen Wegen unabhängig voneinander entwickelt haben.

1.5. Topologie der Atmungskette

Die Komponenten der Elektronentransportkette für die reduktive Dechlorierung sind nur unzureichend untersucht. Die Elektronen-generierenden Enzyme (Hydrogenase und Formiatdehydrogenase) sind nachweislich membrangebunden. Es konnte sowohl in Experimenten mit Methylviologen als alternativem Elektronenakzeptor als auch mit dem Hydrogenaseinhibitor Cu^{2+} gezeigt werden, dass die Hydrogenase und die Formiatdehydrogenase periplasmatisch lokalisiert sind (Miller et al. 1996, 1997; Schumacher und Holliger 1996; Louie und Mohn 1999). Die reduktiven Dehaloge-

nasen sind in den meisten Fällen membrangebundene Enzyme. Nur aus wenigen Organismen wurden die Proteine aus der löslichen Fraktion isoliert (Tab. 1). Für die Beteiligung an einem respiratorischen Prozess muss eine membranassoziierte Lokalisation gefordert werden. Ob jedoch die Dehalogenase periplasmatisch oder zytoplasmatisch lokalisiert ist, wird weiterhin kontrovers diskutiert.

Bei einigen Bakterien konnte an permeabilisierten Zellen mit Methylviologen als Elektronendonator eine Erhöhung der Dechlorierungsaktivität gezeigt werden (Miller et al. 1996, 1997; Schumacher und Holliger 1996; van de Pas 2000). Dies deutet auf eine zytoplasmatische Lokalisation hin. Ähnliche Versuche mit *Dehalococcoides ethenogenes* zeigten keine Veränderungen der Dechlorierungsaktivitäten nach Permeabilisierung der Zellen (Hölscher et al. 2003; Nijenhuis und Zinder 2005). In *Desulfitobacterium hafniense* Stamm Y51 konnte im Westernblot in der periplasmatischen Fraktion die Dehalogenase nachgewiesen werden (Suyama et al. 2002). Ebenso kann es möglich sein, dass sich die Topologie der Atmungsketten von Organismus zu Organismus unterscheiden.

Ist die Dehalogenase zytoplasmatisch lokalisiert, reicht die Oxidation von Wasserstoff zu Protonen im Periplasma und der Verbrauch von Protonen durch die Dechlorierung im Zytoplasma zum Aufbau einer protonenmotorischen Kraft. Für den Fall, dass die Dehalogenase im Periplasma lokalisiert ist, müsste eine Protonentranslokation während des Elektronentransfers postuliert werden.

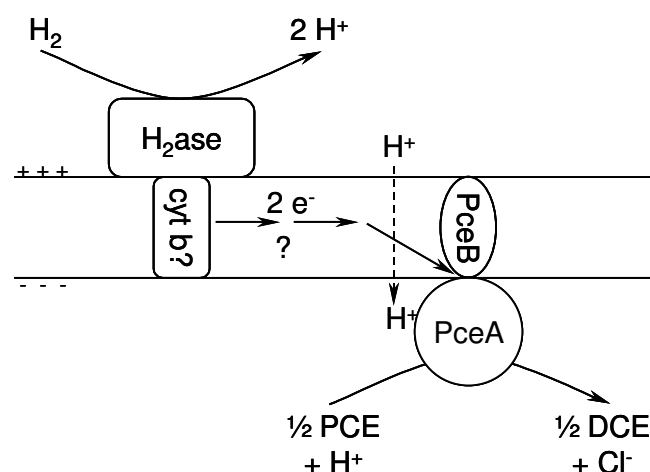


Abb. 1 Modell der Dehalorespiration in *S. multivorans* (nach Holliger et al. 1998a). H_2ase : Hydrogenase, cyt b: Cytochrom b, PceB: mutmaßlicher Membrananker für PceA, PceA: PCE-Dehalogenase, gestrichelte Linie: deutet reorientierten Elektronentransport an.

Aufgrund der Untersuchungen zur Lokalisation der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* (Miller et al. 1996) wurde das in Abbildung 1 dargestellte Modell als Arbeitshypothese entworfen (Holliger et al. 1998a). Die Untersuchungen wurden an Zellen durchgeführt, die auf Pyruvat/Fumarat kultiviert worden waren und die auch in Abwesenheit von PCE die Dehalogenase exprimierten. Nur die Dehalogenase von *Desulfitobacterium hafniense* Stamm PCE-S ist als weiteres Enzym beschrieben, dass ebenfalls in Abwesenheit von PCE exprimiert wird (Miller et al. 1998). Alle anderen bisher bekannten Dehalogenasen wurden als induzierbar beschrieben (Tab. 1).

1.6. Komponenten der Atmungskette

Menachinon wurde als Elektronenüberträger in der Zytoplasmamembran zwischen der Hydrogenase und der terminalen Dehalogenase in *Dehalobacter restrictus* postuliert. Neben spektroskopischen Methoden wurden für die Untersuchungen das Menachinonanalogon 2,3-Dimethyl-1,4-Naphthochinon sowie der spezifische Inhibitor 2-n-Heptyl-4-Hydroxychinolin-N-oxid (HOQNO) verwendet (Schumacher und Holliger 1996). Auch in anderen Organismen konnten (Mena)Chinone nachgewiesen werden (Scholz-Muramatsu et al. 1995; Louie et al. 1997; van de Pas 2000). Die Beteiligung in der Elektronentransportkette für die reduktive Dechlorierung wurde bisher nicht experimentell belegt.

Aktuelle Untersuchungen an *S. multivorans* deuten darauf hin, dass Menachinon als Elektronenüberträger für die PCE-Dehalogenase fungieren könnte (Krauter 2006). Die Verwendung von Diphenyliodid, ein Hemmstoff für Flavoproteine, brachte die Dechlorierung in Zellsuspensionsversuchen vollständig zum Erliegen. Somit muss nun auch eine Flavinkomponente als Elektronenüberträger in Betracht gezogen werden (Krauter 2006).

Des weiteren wurde das Vorkommen von Cytochromen, potentielle Elektronenüberträger in der Membran, in verschiedenen dehalogenierenden Bakterien beschrieben. In *S. multivorans* (Scholz-Muramatsu et al. 1995), *D. restrictus* (Holliger et al. 1998b) sowie *D. dehalogenans* (van de Pas 2000) wurden Cytochrome des *b*-Typs gefunden und für die letzten beiden Organismen wird die Beteiligung dieser am Elektronentransport durch Differenzspektroskopie diskutiert. Membrangebundene Cytochrome des *c*-Typs sind in *D. tiedjei* (Louie et al. 1997), *D. hafniense* Stamm

DCB-2 (Christiansen und Ahring 1996) und TCE1 (Gerritse et al. 1996), *D. dehalogenans* (van de Pas 2000), *Desulfitobacterium* Stamm PCE1 (Gerritse et al. 1996) und *Desulfuromonas chloroethenica* (Krumholz 1997) nachgewiesen worden. Biochemische Untersuchungen an *D. dehalogenans* (van de Pas 2000) lassen die Beteiligung von *c*-Typ-Cytochromen vermuten. Für *D. tiedjei* konnte eine Koinduktion von Cytochrom *c* mit der Dechlorierungsaktivität gezeigt werden (Louie et al. 1997). Eindeutige Beweise, dass dieses Cytochrom der physiologische Elektronendonator für die Dehalogenase ist, fehlen bis jetzt.

Das Redoxpotential des Cob(II)/Cob(I)alamin-Redoxpaares des enzymgebundenen Kofaktors wurde mit -380 mV bestimmt (Siebert 2002). Wenn (Mena)Chinon oder ein Cytochrom mit ihrem viel positiveren Redoxpotential als Elektronendonoren angenommen werden, ergibt sich für die im Zuge der Reaktion notwendige Reduktion von Co(II) zu Co(I) ein thermodynamisches Problem. Dieses könnte einen revertierten Elektronentransport erforderlich machen, bei dem ein Elektron zusammen mit einem Proton über die Membran transportiert wird (in Abb. 1 mit unterbrochener Linie angedeutet, Holliger et al 1998a). Daraus resultiert ein verminderter Protonengradient für die ATP-Synthese, der in Übereinstimmung mit der für *S. multivorans* bestimmten Wachstumsausbeute (Y_S) bei Wachstum auf Wasserstoff und PCE ist (Scholz-Muramatsu et al. 1995).

1.7. Regulation der Dehalogenasen

Die biochemische Charakterisierung reduktiver Dehalogenasen hat in den letzten Jahren zum besseren Verständnis der Dehalorespiration beigetragen. Über die Regulation der Dehalogenasen ist jedoch noch sehr wenig bekannt. Dies liegt vor allem daran, dass keine geeigneten genetischen Systeme bestehen, die diese Untersuchungen vereinfachen würden.

Die obligate Operonstruktur (Tab. 1) der Dehalogenasen (*ab* oder *ba*) ließ auf eine funktionelle Kopplung dieser beiden Proteine schließen. Die Expression des B-Gens konnte bis heute noch nicht gezeigt werden. Aufgrund seines hydrophoben Charakters wurde jedoch eine Funktion als Membrananker für die reduktive Dehalogenase diskutiert (Neumann et al. 1998). Diese Hypothese der funktionellen Kopplung wurde durch den Nachweis der Kotranskription der beiden Gene *ab/ba* in verschiedenen Organismen unterstützt. Sie konnte bisher für die Operone von *S. multi-*

vorans (Neumann et al. 1998), *D. dehalogenans* (Smidt et al. 2000), *Desulfitobacterium* Stamm KBC1 (Tsukagoshi et al. 2006) sowie für die Vinylchlorid-Reduktase von *Dehalococcoides* Stamm VS (Müller et al. 2004) nachgewiesen werden. Weitere Informationen über die Produkte der B-Gene fehlen jedoch.

1.7.1. Regulation der *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase von *Desulfitobacterium dehalogenans*

Neben dem Gen für die Dehalogenase und dem putativen Membranankerprotein sind in dem Operon der *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase von *D. dehalogenans* sechs weitere Gene organisiert. Das Operon hat folgende Struktur: *cprTKZEBCD*. Ausgenommen von *cprT* werden alle Gene in derselben Richtung wie die Gene *cprBA* transkribiert (Smidt et al. 2000). Northernblot-Analysen zeigten, dass *cprK* konstitutiv exprimiert wird, wohingegen die Transkription (Expression) von *cprT*, *Z*, *E*, *B*, *A*, *C* und *D* durch das Substrat 3-Chlor-4-Hydroxyphenylacetat (ClOHPA) induziert wird. Zusätzliche RT-Experimente konnten die Kotranskription der Gene *cprBA*, *cprAC*, *cprCD* sowie *cprKZ* nachweisen. In Kombination mit den Northernblot-Analysen wurde auf eine Kotranskription der Gene *cprBACD* geschlossen (Smidt et al. 2000).

Durch Datenbankvergleiche wurden den entsprechenden Genen bzw. ihrer Produkte mögliche Funktionen zugewiesen. Somit wurde für CprC eine Funktion als membrangebundener Regulator des NosR/NirI-Typs, erstmals als Expressionsregulator einer N₂O-Reduktase beschrieben, postuliert. Die Gene *cprD* und *cprE* zeigen Homologien zu Chaperonen des GroEL-Typs (Hitzeschockprotein). Das Gen *cprT* zeigt Ähnlichkeiten zu einem Triggerfaktor (Peptidyl-Prolyl-Isomerase), der in der Proteinfaltung involviert ist. Für *cprK* wurden Homologien zu Transkriptionsfaktoren der Cpr-Fnr-Familie gefunden.

Es konnte gezeigt werden, dass CprK das Substrat ClOHPA mit hoher Affinität bindet. Nur in Anwesenheit des Substrats erfolgt dann die Bindung des Komplexes (CprK plus ClOHPA) an den Promotor mit anschließender Transkription der entsprechenden Gene (Pop et al. 2004). Neuere Ergebnisse bezüglich der Funktionsweise von CprK haben zu einem komplexen Modell geführt (Gabor et al. 2006; Pop et al. 2006). Demnach liegt der Transkriptionsfaktor CprK als Dimer vor und kann sowohl in oxidiert als auch in reduzierter Form das Substrat (ClOHPA) binden. Im oxidiert-

ten Zustand wird die Bindung an die DNS durch intermolekulare Disulfidbrücken zwischen den CprK-Monomeren verhindert. Erst wenn diese als freie SH-Gruppen unter reduzierenden Bedingungen vorliegen, wird nach Bindung des Effektors (ClOHPA) die DNS-Bindedomäne gebildet und somit die Bindung von CprK an die spezifische Promotorsequenz ermöglicht. Random-Transpositions-Experimente in *D. dehalogenans* lassen weiterhin vermuten, dass an der Regulation der *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase eine Sensor-Histidinkinase eines Zwei-Komponentensystems beteiligt sein könnte (Smidt et al. 1999)

1.7.2. Regulation anderer reduktiver Dehalogenasen

Eine ähnliche Regulation wie für *D. dehalogenans* wird für *Desulfitobacterium* Stamm KBC1 postuliert. Hier befindet sich downstream der Gene *prdAB* ein weiterer Leserahmen *prdK* (allerdings in entgegengesetzter Orientierung), welcher für ein putatives Regulatorprotein kodiert. Die Annahme wird durch Northernblot-Analysen bekräftigt, die zeigen, dass die Transkription von *prdA* strikt PCE-abhängig ist (Tsukagoshi et al. 2006). Die Bindung von PCE an PrdK mit anschließender Bindung an die DNS konnte allerdings noch nicht gezeigt werden.

Aufgrund der kompletten Genomsequenz von *Dehalococcoides ethenogenes* (Seshadri et al. 2005) kann auch in diesem Organismus von einer Regulation auf der Ebene der Transkription ausgegangen werden. Neben den beiden schon charakterisierten Dehalogenasen (Tab. 1) konnten 15 weitere putative Dehalogenasen im Genom identifiziert werden. In der unmittelbaren Umgebung dieser Gene fanden sich bis auf eine Ausnahme Gene für Transkriptionsregulatoren des Zweikomponenten-Typs. Es handelt sich dabei um zytoplasmatische Histidin-Kinasen, die vermutlich Veränderungen im Zellinneren (Redoxzustand) erkennen und somit auf veränderte Umweltbedingungen reagieren können. Eine andere Hypothese geht von der direkten Erkennung der chlorierten Substrate aus, wodurch die Transkription der entsprechenden Gene initiiert wird.

Im Operon der Vinylchlorid-Reduktase von *Dehalococcoides* Stamm VS ist downstream von *vcrAB* ein weiteres Gen (*vcrC*) organisiert. Dieses Protein ist zu 25% mit CprC von *D. dehalogenans* identisch, für das eine Funktion als Transkriptionsregulator (NosR/NirI-Typ) postuliert wurde. Sequenzvergleiche mit dem Proteom von *D. ethenogenes* zeigten 4 Proteine mit großer Ähnlichkeit. Zwei der sie kodier-

enden Gene wurden in unmittelbarer Nähe putativer Dehalogenasen gefunden. Die anderen beiden wurden downstream von *tatB*- und *tatC*-Homologen gefunden (Müller et al. 2004). Die Genprodukte (TatB und TatC) sind Komponenten des Tat-Apparats, welcher Proteine mit dem Tat-Motiv ins Periplasma transportiert. Eine mögliche direkte Kopplung der Transkription (Expression) von reduktiven Dehalogenasen und Komponenten des Tat-Apparats bedarf allerdings noch der experimentellen Bestätigung.

Die Beteiligung des Tat-Apparats an der Reifung der reduktiven Dehalogenasen wird durch den Befund bekräftigt, dass sich downstream der Gene *pceABCT* in *D. hafniense* TCE1 ein kurzer offener Leserahmen befindet (Maillard et al. 2005). Dieser zeigt Homologien zu *tatA*, einer Komponente des Tat-Apparats. Das gesamte Operon befindet sich zwischen zwei Insertionssequenzen. Es konnte gezeigt werden, dass das Operon der PCE-Dehalogenase in diesem Organismus auf einem Transposon lokalisiert ist, welches durch Bildung eines zirkulären Intermediats verloren gehen kann. Die Ursachen für das Ausschneiden aus dem Genom wurden jedoch nicht untersucht. Sequenzvergleiche deuten darauf hin, dass die Gene für die PCE-Dehalogenase in *D. hafniense* Stamm PCE-S und Stamm Y51 ebenfalls auf einem Transposon lokalisiert sind.

Die Subkultivierung von *D. hafniense* Stamm Y51 auf Pyruvat/Fumarat in Anwesenheit von PCE, TCE oder *cis*-DCE zeigte einen interessanten Effekt auf das Wachstumsverhalten der Zellen. TCE stimulierte das Wachstum der Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne chlorierte Substrate, wohingegen die Gabe von PCE oder *cis*-DCE das Wachstum inhibierte (Furukawa et al. 2005). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PCE und *cis*-DCE das auf einem Transposon organisierte Operon der PCE-Dehalogenase destabilisieren. In Anwesenheit von PCE konnte in 80% der Zellen nach fünf Subkultivierungen das Gen der PCE-Dehalogenase nicht mehr nachgewiesen werden, im Falle von *cis*-DCE konnte *pceA* gar nicht mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu hatten Zellen in Anwesenheit von TCE nach fünf Subkultivierungen das Gen nicht verloren. Aber auch in Abwesenheit chlorierter Substrate kam es im Laufe von Subkultivierungen zum Verlust der PCE-Dehalogenaseaktivität (Futagami et al. 2006). Die Autoren konnten zeigen, dass dieser Verlust mit dem Verlust des Transposons bzw. mit dem Verlust der Promotorstruktur von *pceA* einhergeht.

Die Genomanalyse von *D. hafniense* Stamm Y51 (Nonaka et al. 2006) zeigte, dass nur noch ein weiteres Operon vorhanden ist, welches für eine reduktive Dehalogenase kodieren könnte. Somit ist der Verlust der PCE-Dehalogenaseaktivität, der mit dem Verlust des Transposons einhergeht, nicht überraschend.

1.7.3. Regulation der PCE-Dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans*

Im Operon der PCE-Dehalogenase von *S. multivorans* sind keine weiteren Gene organisiert, deren Produkte regulatorische Funktion haben könnten (Neumann et al. 1998). Die Untersuchung eines nicht-dechlorierenden Stamms von *S. multivorans* (Stamm N) ergab, dass dieser den spezifischen Kofaktor der PCE-Dehalogenase von Stamm K nicht enthält (Siebert 2002). Obwohl die Gene für die PCE-Dehalogenase zu 100% identisch sind, war die Transkriptionsrate für *pceA* im Stamm K um ein Vielfaches höher als im nicht-dechlorierenden Stamm N. Eine Expression von PceA im Stamm N konnte im Westernblot nicht nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten, dass das fehlende Corrino eine Rolle in der Regulation der Transkription/Translation spielen könnte. Dieses Phänomen ist als Riboswitch bekannt (Nudler und Mironov 2004).

1.8. Ziel der Arbeit

Reduktive Dehalogenasen, unlängst als eine Gruppe Vitamin-B₁₂-abhängiger Enzyme beschrieben (Holliger et al. 1998a; Banerjee und Ragsdale 2003), galten lange Zeit trotz verschiedener Substratspektren als homogene Enzymgruppe, die viele biochemische und molekularbiologische Gemeinsamkeiten aufweisen. Neuere Untersuchungen (Okeke et al. 2001; Boyer et al. 2003) weisen jedoch darauf hin, dass es vermutlich reduktive Dehalogenasen mit anderen Eigenschaften gibt und die Gruppe dieser Enzyme heterogener wird.

Die Untersuchung zur Lokalisation der PCE-Dehalogenase wurde mit Pyruvat/Fumarat-kultivierten Zellen durchgeführt (Miller et al. 1996). Die Ergebnisse dieser Versuche führten zu der Annahme, dass PceA, trotz Tat-Motiv, ein zytoplasmatisches Protein ist. Für die Energiekonservierung durch Elektronentransportphosphorylierung wurde eine Assoziation mit der Membran postuliert.

Die zytoplasmatische Lokalisation der PCE-Dehalogenase ist nicht mit dem Dogma der periplasmatischen Lokalisation von Tat-Proteinen vereinbar. Dieser Widerspruch sollte aufgeklärt werden. Dabei sollte auch der mögliche Einfluss von PCE und TCE auf die Lokalisation des Enzyms näher untersucht werden.

Im Laufe der Arbeit wurde festgestellt, dass durch Subkultivierung des Organismus über einen längeren Zeitraum auf Pyruvat/Fumarat die Aktivität der Dehalogenase verloren ging. Der Einfluss der fehlenden Dehalogenase auf den Gehalt des spezifischen Corrinoid-Kofaktors in den subkultivierten Zellen sollte abgeschätzt werden. Des weiteren sollte erstmalig das Induktionsverhalten der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* untersucht werden.

Die Gene *pceAB* von *S. multivorans* haben vier Nukleotide gemeinsam. Dieses Phänomen, in der Literatur als "Overlapping Genes" bezeichnet (Normark et al. 1983), ist weit verbreitet und für Gene beschrieben, deren Produkte in einem bestimmten Verhältnis zueinander benötigt werden. Das stöchiometrische Verhältnis der Genprodukte PceA/B sollte durch heterologe Expressionsstudien in *E. coli* bestimmt werden, um einen Hinweis auf die Funktion von PceB zu erhalten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Kultivierung von *Sulfurospirillum multivorans*

Die Kultivierung von *Sulfurospirillum multivorans* wurde bei 28 °C in anaerobem Mineralmedium durchgeführt (Scholz-Muramatsu et al. 1995). Das Medium setzte sich aus verschiedenen komplexen Lösungen zusammen, die im folgenden beschrieben werden. Das Basalmedium enthielt je Liter 0,2% (w/v) Hefeextrakt; 0,07 g Na_2SO_4 ; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,25 g NH_4Cl ; 1,0 g NaCl ; 0,4 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g KCl ; 0,15 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, des weiteren 10 ml Supplementlösung; 40 ml 1 M NaHCO_3 ; 1 ml 5% (w/v) Cysteinhydrochlorid; 2,5 ml 36 mM FeSO_4 (in 50 mM H_2SO_4) sowie die benötigten Substrate. Die Supplementlösung bestand aus Vitaminen und Spurenelementen mit folgender Zusammensetzung: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 enthielt je Liter als Spurenelemente 1,6 mM HCl ; 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 7 mg ZnCl_2 ; 10 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,6 mg H_3BO_3 ; 13 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2,4 mg $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 3,6 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,26 mg $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 0,66 mg Na_2WO_4 sowie 5 mg Cyanocobalamin; 4 mg p-Aminobenzoessäure; 1 mg Biotin; 10 mg Nikotinsäure; 5 mg Calciumpantothenat; 15 mg Pyridoxamin 2HCl und 10 mg Thiamin HCl. Das Basalmedium wurde ohne die weiteren Zusätze anaerobisiert und autoklaviert. Erst danach wurde das Medium mit separat anaerobisierter und autoklavierter FeSO_4 -und Cysteinlösung, NaHCO_3 sowie der Supplementlösung mit sterilen Spritzen komplettiert. Zur Herstellung der Supplementlösung wurden die Vitamine und Spurenelemente in Wasser gelöst und anaerobisiert und anschließend zum anaeroben und autoklavierten Phosphatpuffer sterilfiltriert zugegeben. Als Substrate wurden Formiat, Pyruvat, Fumarat und Lactat mit einer Endkonzentration von 40 mM verwendet. Wenn Formiat als Energiequelle verwendet wurde, enthielt das Medium 5 mM Acetat als Kohlenstoffquelle. PCE wurde mit einer Endkonzentration von 10 mM eingesetzt. Dazu wurde auf 50 ml Medium 1 ml einer 0,5 M PCE-Stammlösung, gelöst in Hexadekan, gegeben. Die Medien wurden mit 10% (v/v) einer gewachsenen Vorkultur beimpft.

2.2. Enzymmessungen an ganzen/permeabilisierten Zellen

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten wurde photometrisch in mit N₂-anaerobisierten Küvetten bei 25 °C durchgeführt (Neumann et al. 1996; Miller et al. 1997). Die Messung wurde durch Zugabe der Suspension von ganzen oder permeabilisierten Zellen gestartet. Die Enzymmessungen mit Methylviologen erfolgten bei 578 nm und mit Benzylviologen bei 546 nm. Die Formiatdehydrogenase wurde durch die Oxidation von Formiat (10 mM) mit Methylviologen ($\epsilon_{578} = 9,7 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) als Elektronenakzeptor in Tris-HCl Puffer (100 mM pH 8,0; 5 mM Methylviologen; 0,5 M Saccharose) gemessen. Die Reaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase wurde mit Benzylviologen ($\epsilon_{546} = 9,75 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) als Elektronenakzeptor in Tris-HCl Puffer (100 mM pH 8,0; 10 mM Benzylviologen; 0,3 mM Pyruvat; 1 mM Coenzym A; 1 mM MgCl₂; 0,5 M Saccharose) photometrisch verfolgt. Die Messung der PCE Dehalogenase wurde durch die Oxidation von reduziertem Methylviologen mit PCE (0,5 mM) als Elektronenakzeptor durchgeführt. Der verwendete Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 100 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM Methylviologen; 4 mM (NH₄)₂SO₄ und 0,5 M Saccharose. Die Aktivität der Fumaratreduktase wurde in Tris-HCl Puffer (100 mM pH 7,5; 5 mM Benzylviologen; 0,5 M Saccharose; 1 mM Fumarat) mit reduziertem Benzylviologen als Elektronendonator bestimmt. Wenn die Viologene als Elektronendonoren (PCE-Dehalogenase und Fumaratreduktase) im Enzymtest dienten, wurden sie vor dem Start der Reaktion durch Zugabe von ganzen bzw. permeabilisierten Zellen mittels Titan(III)citrat chemisch bis zu einer Absorption von ~3,0 reduziert (Zehnder und Wuhrmann 1976). Fungierten die Viologene hingegen als Elektronenakzeptoren (Formiatdehydrogenase und Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase), wurden sie durch Zugabe von Titan(III)citrat nur bis zu einer Absorption von 0,5-1,0 reduziert. Die Enzymaktivitäten errechnen sich aus der Abnahme bzw. Zunahme der Absorption durch Oxidation bzw. Reduktion der verwendeten Viologene nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten von *S. multivorans* wurde der Organismus über sieben Tage auf verschiedenen Substratkombinationen kultiviert. Die Zellen der siebten Passage wurden durch Zentrifugation (5000xg, 10 min) anaerob geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet in Tris-HCl Puffer (50 mM pH 7,5; 0,25 M Saccharose; 0,1 M KCl; 4 ml pro g Feuchtzellen) resuspendiert. Die Suspension wurde 1:10 im selben Puffer verdünnt und mit Protamin (100 µg ml⁻¹) oder Lyso-

zym (3 mg ml^{-1}) für 30 min bei 25°C inkubiert. Die Kontrollen wurden in Abwesenheit von Lysozym oder Protamin 30 min bei 25°C inkubiert. Die Messungen der Enzymaktivitäten lysozymbehandelter Zellen erfolgten in saccharosefreiem Puffer, um eine nahezu vollständige Lyse der Zellen sicherzustellen. Die Proteinkonzentrationen der Zellsuspension wurden nach Bradford (1976) mit dem Biorad-Reagenz (Biorad, München) bestimmt. Alle Schritte, die anaerobe Bedingungen erforderten, wurden in einer Anaerobenkammer (Töpfer Lab Systems, Göppingen) unter N_2/H_2 -Atmosphäre (95%/5%) oder in mit N_2 -anaerobisierten Flaschen bzw. Küvetten durchgeführt.

2.3. Immunologische Methoden

2.3.1. SDS-Gelelektrophorese

Mit der SDS-PAGE ist eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe unabhängig von der Ladung möglich (Ausubel et al. 1987). Dazu wurde die vertikale Minianlage von Biometra (Göttingen) verwendet. Die Gele wurden selbst hergestellt und hatten folgende Zusammensetzung: Trenngel: 410 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 12-15% Acrylamid (Rotiphorese[®] Gel 30; Roth, Karlsruhe); 2,7 mM TEMED und 4,4 mM APS. Durch Zugabe des APS wurde die Polymerisation des Acrylamids und des Bisacrylamids mit dem TEMED gestartet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel mit folgender Zusammensetzung gegossen: 58 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,05% SDS; 5% Acrylamid (Rotiphorese[®] Gel 30); 6,4 mM TEMED; 4,4 mM APS. Für die Elektrophorese wurde das diskontinuierliche Laemmli-System verwendet (Laemmli 1970). Der Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 25 mM Tris; 100 mM Glycin; 0,1% SDS. Die Proteinproben wurden 1:2 mit Ladepuffer (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glyzerin; 10% (v/v) Mercaptoethanol; 0,01% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 12 mA (Sammelgel) bzw. 25 mA (Trenngel) pro Gel durchgeführt.

Nach der Gelelektrophorese wurden die SDS-Gele in 25 % (v/v) Isopropanol und 10 % (v/v) Essigsäure für 15 min fixiert und anschließend im Färber (240 mg l^{-1} Coomassie Brilliant Blau G250 in 10% (v/v) Essigsäure) 20-30 min gefärbt. Zum Entfärben des Hintergrundes wurden die Gele in 10% (v/v) Essigsäure gewaschen.

2.3.2. Darstellung der PCE-Dehalogenase im Westernblot

Für die Westernblotanalysen wurde 1 µg Gesamtprotein von *S. multivorans* über SDS-PAGE (15%) aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Ausubel et al. 1987) mit einer Semi-Dry-Blotanlage (Biorad, München) geblottet (15 V, 1 h). Zuvor wurde die Membran und das SDS-Gel für 20 min im Blotpuffer (25 mM Tris, 100 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol) äquilibriert. Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte die Absättigung der unbesetzten Stellen für 1 h in 1% Western-Blocking-Solution (Roche, Mannheim) in PBST (140 mM NaCl; 10 mM KCl; 6,4 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 0,05% (v/v) Tween 20). Anschließend wurde die Membran 3 x 10 min in PBST gewaschen und bei 18°C ü/N mit dem gereinigten Antikörper (1:50000 in PBST) inkubiert. Am Tag danach wurde die Membran 3 x 10 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Biorad, München), verdünnt 1:3000 in PBST, für 1 h bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Waschen in PBST (3 x 10 min) wurde die Membran für 2 min in 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂ äquilibriert. Im selben Puffer erfolgte die Reaktion der alkalischen Phosphatase durch Zugabe der Substrate (pro ml: 0,34 mg NBT und 0,175 mg X-Phosphat). Die Reaktion wurde nach 10 min mit 10 mM Tris-HCl pH 7,4 und 1 mM EDTA gestoppt. Die Färbung des Proteinmarkers auf der Blotmembran erfolgte für 5 min in 0,2% (w/v) Coomassie® Brilliantblau G250; 45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure. Durch Waschen in 90% (v/v) Methanol mit 7% (v/v) Essigsäure wurde nicht durch Protein gebundener Farbstoff entfernt und somit die Markerbanden sichtbar gemacht. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1976) mittels Biorad-Reagenz (Biorad, München).

2.3.3. Reinigung der PceA-spezifischen Antikörper

PceA wurde in *E. coli* BL21 (DE3) RIL pPCEA bei 37°C heterolog exprimiert. Die Induktion der Kultur erfolgte bei OD₅₇₈ ~0,5 mit IPTG (0,3 mM) und wurde nach 3 h beendet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (12000xg, 4°C, 10 min) geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte mit Lysozym (1 mg ml⁻¹ in 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM DTT; 0,1 mg DNaseI) bei 37°C für 3 h. 0,5 ml der erhaltenen Suspension

wurde bei 16000xg für 20 min zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 2 ml Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,2 M NaCl; 1% Natriumdesoxycholat) resuspendiert und homogenisiert (15 min, RT). Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (16000xg, 20 min) und das Pellet in 2 ml Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,25% Natriumdesoxycholat) resuspendiert und homogenisiert (15 min, RT). Der letzte Zentrifugations- und Resuspensionsschritt wurde 3 mal wiederholt. Das Pellet wurde abschließend in 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 8 M Harnstoff resuspendiert (= Inclusion-Body-Fraktion, IBF).

Die IBF wurde über SDS-PAGE (12%) gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde mit 0,2% Ponceau S in 3% Trichloracetat gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen. Die PceA-Banden wurden ausgeschnitten und 30 min in 10 ml 1% Western-Blocking-Solution (in PBST) inkubiert. Die Streifen wurden anschließend für 10 min in PBST gewaschen, für 10 min in 1:20 in PBST verdünntem Serum inkubiert und abschließend wieder für 10 min mit PBST gewaschen.

Die PceA-spezifischen Antikörper wurden durch eine sprunghafte Änderung des pH-Werts von der Membran gelöst. Dazu wurden die Streifen 2 x 3 min mit 1 ml Glycin-HCl pH 2,5 behandelt. Zu den Antikörperfraktionen wurde 1 M KH_2PO_4 gegeben, um den pH-Wert auf 7,0-7,5 einzustellen. Die Prozedur wurde 10 mal wiederholt, um 20 ml Fraktionen zu erhalten. Die Fraktionen wurden mit PallFiltron 50K-Filtereinheiten (Pall German Laboratory, Dreieich) konzentriert, mit PBST wiederholt gewaschen und auf ein Volumen von 750 μl eingeeengt. Zur Stabilisierung wurde der Antikörperfraktion 0,1% (w/v) RSA zugesetzt. Die Proteinkonzentration der Antikörperfraktion wurde nach Bradford bestimmt und betrug 1,35 mg ml^{-1} . Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.4. Elektronenmikroskopie

2.4.1. Gefrierbruch und Immunogoldmarkierung

S. multivorans-Kulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet (5 min, 5000xg, 28°C). Die Zellen wurden mit substratfreiem Medium gewaschen und erneut zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in diesem Medium bei 28°C in anaeroben Serumflaschen gelagert (maximal 30-60 min). Die chemisch nicht fixierten Zellen wurden zwischen zwei 0,1 mm Kupfernetze getropft (BAL-TEC, Liechtenstein), die für die Doppelabdrucktechnik benutzt werden. Die Proben wurden schnell eingefroren. Dazu wurden die Kupfernetze in ein durch flüssigen Stickstoff gekühltes flüssiges Ethan:Propan-Gemisch (1:2) gelegt. Der Gefrierbruch erfolgte in der Gefrierbruchanlage BAF400T (BAL-TEC, Liechtenstein) bei -150°C. Im Gegensatz zur herkömmlichen Prozedur mit Platin als erste Bedampfungsschicht (Kontrastmittel für die Elektronenmikroskopie) und Kohlenstoff als zweite Schicht (erhöht die Stabilität der Replika) wurden die Gefrierbrüche in umgekehrter Reihenfolge bedampft. Zuerst erfolgte die Bedampfung mit einer 20 nm dicken Kohlenstoffschicht (im 90° Winkel) und im zweiten Schritt wurde mit Platin (2 nm dick, im 35° Winkel) bedampft (Westermann et al. 2007).

Für die Markierung mit dem PceA-spezifischen Antikörper wurden die erhaltenen Replika in eine Waschlösung (10 mM Tris-HCl pH 8,4; 2,5% (w/v) SDS; 30 mM Saccharose) transferiert und über Nacht inkubiert (Fujimoto 1997). Anschließend wurden die Replika in PBS (75 mM NaCl; 12,5 mM NaH₂PO₄; 67 mM NaHPO₄ pH 7,2) mehrmals gewaschen, um das SDS zu entfernen. Danach folgte eine Inkubation im LBB ("Labeling-Blocking-Buffer": 1% BSA; 0,5% Gelatine; 0,005% Tween 20). Die gewaschenen Replika wurden über Nacht in einem Tropfen des PceA-Antikörpers, 1:200 in LBB verdünnt, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Replika 4 mal mit LBB gewaschen und für eine Stunde mit dem sekundären goldmarkierten Antikörper (Anti-Kaninchen-Antikörper, gekoppelt mit 10 nm Goldpartikeln, British Biocell International, Cardiff, UK) 1:50 verdünnt in LBB inkubiert. Nach der Immunogoldmarkierung wurden die Replika 4 mal mit PBS gespült und für 10 min mit 0,5% Glutardialdehyd in PBS fixiert, erneut 4 mal mit destilliertem Wasser gewaschen und auf mit Formvar befilmte EM-Netzchen gepickt. Die Untersuchungen wurden mit einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM 900, Zeiss, Oberkochen) durchge-

führt. Alle Gefrierbruchaufnahmen sind in Richtung der Platinbedampfung von unten nach oben dargestellt.

Für die Untersuchung des Bruchverhaltens in Abhängigkeit der Kulturbedingungen wurden die Zellen nach dem Gefrierbruch in der normalen Reihenfolge (zuerst Platin mit 35° und anschließend Kohlenstoff mit 90°) bedampft und anschließend mit 1:2 in Wasser verdünntem Natriumhypochlorit gesäubert (Moor und Mühlethaler 1963). Nach dem Waschen mit Wasser wurden die Replika auf Kupfernetze gepickt und mit dem TEM ausgewertet.

2.4.2. Oberflächen-Replika

Die Zellen wurden wie für die Gefrierbruchanalysen behandelt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 2% (v/v) Glutardialdehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (1 h RT, anschließend 4°C ü/N). Bei dem letzten Schritt sedimentieren die Zellen. Durch Austausch des Überstandes gegen Wasser wurden die Zellen gewaschen (Lagerung 4°C ü/N). Nach nochmaliger Verdünnung der Zellen wurden sie auf eine Acetatfolie (Biodenfolie) aufgebracht und luftgetrocknet. Zuvor wurde die Folie mit Tensiden benetzbar gemacht. Die Oberflächenbedampfung (Replikation) der Folien erfolgte in der Gefrierbruchanlage BAF400T (BAL-TEC, Liechtenstein) bei Raumtemperatur unter 35° mit 2 nm Platin und unter 90° mit ca. 25 nm Kohlenstoff. Die Replika wurden durch Weglösen der Acetatfolie in 70% (v/v) H₂SO₄ über zwei Stunden und nachfolgend mit heißer konzentrierter HNO₃ gereinigt (Meyer und Winkelmann 1969). Die Auswertung der Replika erfolgte mit dem TEM.

2.5. Extraktion von Corrinoiden aus Rohextrakt

Zellen von *S. multivorans* (gewachsen auf je 40 mM Pyruvat/Fumarat) wurden in Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM DTT; 3 ml pro g Feuchtzellen) resuspendiert und mit einer French Press (Heinemann, Schwäbisch Gmünd) aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde durch Ultrazentrifugation (123000xg, 40 min, 10°C) erhalten.

Die Extraktion der Corrinoiden aus den Rohextrakten erfolgte mit 0,1 M Kaliumcyanid (Stupperich et al. 1986). Dazu wurde der Rohextrakt mit Essigsäure (100%) auf einen pH-Wert von 5,0 angesäuert. Anschließend wurde kristallines Kaliumcyanid

zugefügt und die Schottflasche sofort verschlossen. Die Proben wurden 15 min in einem Wasserbad unter Rühren gekocht und anschließend abgekühlt. Der Cyanidextrakt wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (12000xg, 10 min, 10°C). Der Überstand wurde in neue Gefäße dekantiert, das Pellet in 10 ml Wasser resuspendiert und wie oben beschrieben reextrahiert.

Die Reinigung der Corrinioide erfolgte mit Hilfe von säulenchromatographischen Methoden. Die erste Reinigung beinhaltete eine hydrophobe Interaktionschromatographie mit XAD-4-Material (Sigma, Deisendorf). Die vereinigten Überstände wurden mit XAD-4-Material (0,25 g ml⁻¹ Cyanidextrakt) über Nacht unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Das Material wurde zuvor mit Methanol gewaschen und in 0,1 mM Essigsäure äquilibriert. Die an das XAD-4-Material gebundenen Corrinioide wurden mit Methanol eluiert. Dazu wurde das Material in eine Leersäule (ID 25 mm) gepackt und mit dem zehnfachen Säulenvolumen Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte mit dem drei- bis fünffachen Volumen Methanol bis die erhaltenen Fraktionen farblos waren. Die eluierten Corrinioide wurden im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Anschließend wurden sie in 0,5-1 ml Wasser aufgenommen und über neutrales Aluminiumoxid zur weiteren Reinigung gegeben. Dazu wurden ca. 3 g Aluminiumoxid in eine Leersäule (ID 10 mm) gepackt und die wässrige Corrinoidlösung auf das trockene Material aufgetropft. Die Elution erfolgte mit Wasser. Die erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Bis zur weiteren Analyse per HPLC wurden die Corrinioide trocken bei -20°C gelagert.

2.6. Analytische Methoden

2.6.1. Analyse der Corrinioide

Zur Analyse der Corrinioide wurde eine HPLC mit Diodenarray-Detektion (Merck, Darmstadt) eingesetzt. Als stationäre Phase wurde Lichrosphere 100 RP-18; 5 µm (ID 5 mm x 250 mm) verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml min⁻¹. Die Corrinioide wurden isokratisch (15 min) mit 23% (v/v) Methanol in 0,08% (v/v) Essigsäure aufgetrennt, gefolgt von einem linearen Gradienten auf 100% (v/v) Methanol in 10 min. Die Elutionsprofile wurden durch die Messung der Absorption bei 360 nm erhalten. Durch

Verwendung des Diodenarrays konnten Corrinoidpeaks im Elutionsprofil anhand der aufgenommenen Absorptionsspektren identifiziert werden.

2.6.2. Quantifizierung von Pyruvat und Fumarat

Die Bestimmung von Pyruvat und Fumarat erfolgte ebenfalls mittels HPLC (Merck, Darmstadt). Als stationäre Phase wurde Lichrosphere 100 RP-8; 5 μm (ID 4,6 mm x 100 mm) verwendet. Die Flüssigphase war 0,3% (v/v) H_3PO_4 bei einer Flussrate von 0,4 ml min^{-1} . Die Retentionszeiten für Pyruvat und Fumarat waren 4,6 und 5,8 min.

2.6.3. Gaschromatographie

Die Konzentrationen von PCE, TCE und *cis*-DCE wurden mittels Gaschromatographie bestimmt (Neumann et al. 1994). Dazu wurde die Säule 10% Ucon LB on WAW (2 m, WGA Analysentechnik, Düsseldorf) verwendet. Als Trägergas diente N_2 mit einem Fluss von 25-30 ml min^{-1} (300 kPa). Folgende Temperaturen wurden eingestellt: Säule 80 °C, Detektor 150 °C, Injektor 250 °C. Die Proben wurden folgendermaßen behandelt: 1 ml Standard oder Kultur wurde gasdicht verschlossen, mit 20 μl Nonan (10 mM in Hexadekan) versetzt und für 6 min bei 96 °C inkubiert. Zur Analyse wurden 250 μl der Gasphase eingespritzt. Die Retentionszeiten unter den gewählten Bedingungen waren: Nonan 3,4 min; PCE 2,9 min; TCE 1,8 min und *cis*-DCE 1,2 min. Standardlösungen (1 mM) von PCE, TCE und *cis*-DCE wurden über Nacht in Wasser eingerührt und ausgehend von dieser in verschiedenen Verdünnungen mit der beschriebenen Methode gemessen. Nonan diente als interner Standard.

2.7. Molekularbiologische Methoden

2.7.1. DNS-Gelelektrophorese

Für die DNS-Gelelektrophorese wurde eine horizontale Anlage von Bio-Rad (Mini Sub[®] Cell GT, Biorad, München) verwendet. Als Puffersystem wurde TAE (20 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM Essigsäure; 2 mM EDTA) eingesetzt. Die Trennung der DNS-Fragmente erfolgte in 0,8-1,2% Agarosegelen bei einer Spannung von

7-9 V cm⁻¹ (1 h, RT). Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Image Master[®] VDS (GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Die DNS-Proben wurden vor der Trennung im Agarosegel mit Ladepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 60% (v/v) Glycerin; 60 mM EDTA; 0,03% (w/v) Bromphenolblau; 0,03% (w/v) Xylencyanol) 1:5 versetzt.

2.7.2. RNS-Isolierung und RT-PCR

Für die Isolierung der RNS wurden ~10 mg Feuchtzellen eingesetzt, die in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet wurden. Die Isolierung wurde nach den Herstellerangaben des verwendeten RNeasy[®]-Mini-Kit (Qiagen[®], Hilden) durchgeführt. Um DNS aus der Probe zu entfernen wurde ein DNaseI-Verdau (Roche, Mannheim) durchgeführt. Dazu wurden zu 20 µl der RNS-Probe 9 µl 5fach Puffer (RT-PCR-Kit), 4 U DNaseI (RNase-frei; Roche, Mannheim) sowie 2 µl RNasin (Promega, Mannheim) zur Stabilisierung der RNS gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die DNaseI wurde durch Inkubation bei 75 °C für 15 min inaktiviert. Die RNS-Konzentration wurde anhand der Absorption bei 260 nm mit der Formel $E_{260nm} = 1 \approx 40 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNS abgeschätzt.

Für die RT-PCR wurden 500 ng RNS als Template eingesetzt. Die RT-PCR wurde mit dem QIAGEN[®] OneStep RT-PCR-Kit (QIAGEN[®]; Hilden) nach den Angaben des Herstellers (50 °C, 1 h) durchgeführt. Für die RT-PCR (Siebert et al. 2002) wurden 25 pmol des Primers D/3501rev TGAGTAAACGCTGTTCTGACTTCAGC verwendet. Für die folgende PCR (MastercyclerPersonal, Eppendorf) wurden 25 pmol des Primers B/3162fw ACACATTAAAAAATAAATACTGTACTTGGGG eingesetzt. Die PCR umfasste folgendes Temperaturprogramm: 96 °C 3 min, 30 x [96 °C 0,5 min, 50 °C 0,75 min, 72 °C 1 min].

2.7.3. Nachweis von *pceA*

Zum Nachweis des Gens der PCE-Dehalogenase in Kulturen von *S. multivorans* nach Subkultivierung auf Pyruvat/Fumarat wurde 1 ml Kultur geerntet und in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Diese wurden in einer Kolonie-PCR als Template eingesetzt. Für die Amplifikation des PCE-Dehalogenase-Gens wurden folgende Primer (je 25 pmol) verwendet: EXP4 ATAGACCATGGAAAAGAAAAAAGCCT-GAACTCTC und EXP5 GCAAGGATCCTCATGATTTTTTAACCCTATCCTTTCTA-

AAGC. Der PCR-Ansatz enthielt ferner je 0,2 mM dNTPs; 1,5 mM MgCl₂; 50mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C); 0,08% (v/v) Nonidet-P40 sowie 2,5 U Taq-Polymerase (Fermentas, St. Leon Roth). Die PCR umfasste folgendes Temperaturprogramm: 96°C 3 min, 30 x [96°C 0,5 min, 60°C 0,75 min, 72°C 1 min].

2.7.4. Konstruktion von Plasmiden

2.7.4.1. Herstellung von LacZ α -Fusionsplasmiden

Der Klonierungsvektor pBlueScript II SK+ (Stratagene, Heidelberg) wurde mittels "Backbone"-PCR mit den Primern pBlue817fw AGCTGTTTCCTGTGTG und pBlue816rv ATGACCATGATTACGCC generiert, um eine Blunt-End-Ligation der Gene von Interesse im Leserahmen mit dem *lacZ α* -Gen zu ermöglichen. Folgendes Programm wurde für die Vektoramplifikation verwendet: 96°C 5 min, 30 x [96°C 0,5 min, 51,4°C 1 min, 72°C 6 min]. Für die Generierung der Inserts wurden folgende 5'-phosphorylierte Primer pceA-Pfw ^PATGGAAAAGAAAAAAAGCCTG, pceA-Prv ^PGCGGCCTTCAATTGATTTTTTAACCC sowie pceB-Prv ^PGCGGCCTTCATACGCT-TAAGCTTTTCCC verwendet. Das Temperaturprogramm umfasste folgende Parameter: 96°C 5 min, 30 x [96°C 0,5 min, 50°C 1 min, 72°C 4 min].

Als Template wurden 50 ng pBlueScript II SK+ bzw. pY179 (Neumann et al. 1998) verwendet. Um Amplifikationsfehler zu vermeiden, wurde die Pfu-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet, welche sich durch eine 3'→5'-Korrekturleseaktivität auszeichnet. Folgende Reaktionsbedingungen wurden eingestellt: jeweils 0,2 mM dNTPs; je 25 pmol Primer; 0,5 U Pfu-Polymerase; Puffer: 20 mM Tris-HCl pH 8,8; 10 mM (NH₄)₂SO₄; 10 mM KCl; 0,1% (v/v) Triton X-100; 0,1 mg ml⁻¹ RSA; 2 mM MgSO₄.

Die in der PCR erzeugten DNS-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem QIAquick[®] Gelextraktionskit (Qiagen[®], Hilden) eluiert und gereinigt. Die DNS-Konzentration der Eluate wurde in einer erneuten Elektrophorese anhand eines Größenstandards (HyperLadder[™] I, Bioline, Luckenwalde) abgeschätzt.

2.7.4.2. Ligation

Zur Ligation wurden die PCR-Fragmente in einem Verhältnis 1:10 (Vektor:Insert) eingesetzt. Für die Ligation wurde die T₄-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet und nach dem Protokoll für eine Blunt-End-Ligation verfahren: 40 mM Tris-HCl (pH 7,8 bei 25°C); 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 5 mM ATP; 5% (w/v) PEG 4000, 1 U T₄-Ligase (2 h, 22°C). Zur Inaktivierung der T₄-Ligase wurde der Ansatz für 15 min bei 65°C inkubiert.

2.7.4.3. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Zellen (*E. coli*) wurden im SOB-Medium (2% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄) bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6 bei 30°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis (10 min) wurden die Zellen geerntet (2500xg, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden in 0,4 Volumen TB-Puffer (10 mM HEPES; 15 mM CaCl₂; 250 mM KCl; pH-Wert mit KOH auf 6,7 eingestellt, danach 55 mM MnCl₂ zugegeben und sterilfiltriert) resuspendiert, erneut gekühlt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet in 0,1 Volumen TB-Puffer resuspendiert und mit DMSO (7% (v/v) Endkonzentration) versetzt. Nach Inkubation auf Eis (10 min) wurden die Zellen portioniert (250 µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

2.7.4.4. Transformation

Zur Transformation von *E. coli* Zellen wurde die Hitzeschock-Methode gewählt (Hanahan 1983; Inoue et al. 1990). Die chemisch kompetenten Zellen (*E. coli* TB1, New England Biolabs) wurden auf Eis aufgetaut, mit dem Plasmid (Ligationsansatz) versetzt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30-40 Sekunden bei 42°C. Danach wurden die Zellen mit 500 µl LB-Medium (5% (w/v) Hefeextrakt; 10% (w/v) NaCl; 10% (w/v) Trypton) versetzt und bei 37°C unter Schütteln inkubiert (1 h). Danach erfolgte das Ausplattieren auf LB-Platten mit 100 µg ml⁻¹ Ampicillin mit anschließender Inkubation bei 37°C (ü/N).

2.7.4.5. Plasmidisolierung

Zur Plasmidisolierung (Birnboim und Doly 1979) wurden 1,5 ml LB-Kultur (ü/N bei 37°C inkubiert) geerntet und in 300 µl TE-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA) resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl 0,2 M NaOH mit 1% (w/v) SDS. Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt. Durch Zugabe von 300 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 erfolgte die Ausfällung der Proteine. Nach einer Inkubation auf Eis (10 min) folgte ein Zentrifugationsschritt (16100xg, 10 min). Der Überstand wurde entnommen und zur Fällung der Plasmid-DNS mit 750 µl Isopropanol versetzt. Dafür wurde die Probe nach Lagerung auf Eis (10 min) erneut zentrifugiert (16100xg, 10 min). Nach Entfernung des Überstands wurde das Pellet mit 100 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend bei 55°C (10 min) getrocknet. Die Plasmid-DNS wurde zum Schluss in 50 µl sterilen Wasser ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$ RNase A; Clontech, Mountain View, USA) resuspendiert und für 15 min bei 37°C inkubiert.

2.7.4.6. Identifizierung positiver Klone

Zur Identifizierung positiver Klone wurden 5 µl Plasmid-DNS mit 3 U PstI (Fermentas, St. Leon-Roth) im entsprechenden Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl_2 ; 100 mM NaCl und $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ RSA) bei 37°C (1 h) behandelt und anschließend mittels Gelelektrophorese analysiert. Es konnten zwei positive Klone für *pceA-lacZ α* und drei positive Klone für *pceAB-lacZ α* identifiziert werden. Die richtige Insertion des DNS-Fragments in den Vektor wurde durch Sequenzierung der Plasmide (GATC, Konstanz) bestätigt.

2.7.4.7. Expressionsversuche

Für die Expression der Fusionsproteine (PceA-LacZ α und PceB-LacZ α) wurden die Plasmide in *E. coli* TB1 RIL umklontiert. Das Plasmid RIL (Stratagene, Heidelberg) trägt Gene für verschiedene tRNAs (*argU*, *ileY*, *leuW*), die in *E. coli* nur selten benutzt werden und für die heterologe Expression von Fremdgenen mit einer anderen Codon-Usage sehr hilfreich sind. Die Kulturen wurden mit einer Vorkultur (28°C ü/N) beimpft, so dass die OD₆₀₀ zwischen 0,1-0,15 lag. Die Induktion erfolgte zwischen OD₆₀₀ 0,4-0,6 mit 0,5 mM IPTG. Über einen Zeitraum von 6 h erfolgte die

Probennahme (1,5 ml). Nach Zentrifugation (16100xg, 2 min, RT) und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen trocken bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.8. Material

Die verwendeten Gase (CO₂ Grad 4.5, N₂ Grad 5.0 und Formiergas (N₂/H₂ 95/5) wurden von Linde (Leuna) bezogen. Die verwendeten Chemikalien stammten von AppliChem GmbH (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), VWR (Darmstadt) in der jeweils höchsten Qualität. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert. Die Enzyme für die DNS-Manipulation wurden von Fermentas (St. Leon Roth) bezogen. Der RT-PCR-Kit stammte von der Firma Qiagen (Hilden). Die sekundären Antikörper wurden von Biobrad (München) bzw. British Biocell International (Cardiff, UK) erworben. Die Immunisierung und Produktion der PceA-Antikörper erfolgte durch die Firma SeqLab (Göttingen).

3. ERGEBNISSE

3.1. Lokalisation der PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans*

Die PCE-Dehalogenase besitzt ein N-terminales Leaderpeptid (Neumann et al. 1998), welches die typische Sequenz für den Tat-abhängigen Transport beinhaltet. Dieses Signalpeptid ist ein Charakteristikum für kofaktorhaltige periplasmatisch lokalisierte Proteine (Berks et al. 2000). Während des Transportes durch den Tat-Apparat wird das Signalpeptid durch eine membranständige Signalpeptidase abgespalten und das prozessierte Protein in das Periplasma entlassen (Palmer et al. 2005). Im Periplasma sollte somit die prozessierte Form und im Zytoplasma die unprozessierte Form der PCE-Dehalogenase vorliegen.

Eine Methode des Nachweises der Lokalisation von Enzymen ist die Messung ihrer Aktivität an ganzen und permeabilisierten Zellen. Dazu eignen sich als alternative Elektronendonoren/-akzeptoren Viologene, da diese die Zytoplasmamembran nicht permeieren können. Somit sollten die Aktivitäten zytoplasmatisch lokalisierter Enzyme nur mit permeabilisierten Zellen messbar sein. Aufgrund früherer Untersuchungen an Pyruvat/Fumarat-gewachsenen Zellen ist die PCE-Dehalogenase als zytoplasmatisch lokalisiertes Enzym beschrieben (Miller et al. 1996). Dies steht jedoch im Widerspruch zum Dogma der periplasmatischen Lokalisation von Tat-Proteinen. Da die PCE-Dehalogenase nicht für das Wachstum auf Pyruvat/Fumarat benötigt wird, stellte sich die Frage, ob das Substrat der PCE-Dehalogenase die Lokalisation des Enzyms beeinflusst. Deshalb wurden verschiedene Substratkombinationen zur Kultivierung ausgewählt, um die Lokalisation der PCE-Dehalogenase in Ab- und Anwesenheit von PCE zu untersuchen. Damit sich die Zellen an die gegebenen Kultivierungsbedingungen adaptieren konnten, wurde der Organismus für die Untersuchungen über sieben Tage auf den entsprechenden Substratkombinationen subkultiviert (= alle 24 Stunden auf frisches Medium überimpft).

Neben den schon erwähnten Lokalisationsstudien durch Enzymmessungen wurden Westernblotanalysen durchgeführt. Mit dem spezifischen PceA-Antikörper konnten beide Formen der PCE-Dehalogenase (prozessiert und unprozessiert) nachgewiesen und somit indirekt auf die Lokalisation des Enzyms geschlossen werden. Zum direkten Nachweis der Lokalisation der PCE-Dehalogenase wurde die Immunogoldmarkierung in Gefrierbruchpräparaten von *S. multivorans* angewendet, um

die indirekten Ergebnisse der Enzymmessungen und der Westernblotanalysen zu unterstützen.

3.1.1. Nachweis der PCE-Dehalogenase durch enzymatische Messungen

Als Kontrolle für die Stabilität der Zellen bzw. der erfolgreichen Permeabilisierung wurden neben der PCE-Dehalogenase die Aktivitäten von Enzymen mit bekannter Lokalisation bestimmt. Dafür wurden die Formiatdehydrogenase (periplasmatisch), die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und die Fumaratreduktase (beide zytoplasmatisch) ausgewählt. Als permeabilisierende Agenzien wurden Lysozym und Protamin verwendet. Sowohl Lysozym als auch Protamin hatten in den verwendeten Konzentrationen keinen stimulierenden oder hemmenden Effekt auf die gemessenen Enzyme. Dies wurde vor den Lokalisationsstudien in Enzymmessungen mit Rohextrakt getestet (nicht gezeigt). Die Saccharose im Messpuffer verdoppelte die Enzymaktivität der Pyruvat:Ferredox-Oxidoreduktase im Rohextrakt im Vergleich zur Messung ohne Saccharose im Testpuffer. Deshalb wurde die prozentuale Verteilung dieses Enzyms mit Lysozym als permeabilisierendes Agens nicht berechnet, weil die Messungen mit bzw. ohne Saccharose im Puffer (Messung an ganzen bzw. lysozymbehandelten Zellen) nicht direkt miteinander zu vergleichen sind. Auf die anderen gemessenen Enzyme hatte die Saccharose keinen stimulierenden oder hemmenden Effekt.

In Tabelle 2 findet sich eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Enzymmessungen. Wie daraus ersichtlich wird, waren die experimentell bestimmten Enzymaktivitäten, abhängig von der Fitness der Zellen, starken Schwankungen unterworfen. Die prozentuale Verteilung der Enzymaktivitäten unterschiedlicher Zellkulturen lagen für jedes Enzym jedoch in vergleichbarer Größenordnung. Die Hauptaktivitäten der Kontrollenzyme wurden unabhängig von dem verwendeten Agens sowie den verwendeten Substratkombinationen in dem erwarteten Kompartiment gemessen. So wurde für die Formiatdehydrogenase eine periplasmatische und für die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase sowie die Fumaratreduktase eine zytoplasmatische Lokalisation bestätigt.

Für die Enzymmessungen der PCE-Dehalogenase, der das eigentliche Interesse galt, waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Zellen, die in Anwesenheit von PCE kultiviert wurden, zeigten, unabhängig vom permeabilisierenden Agens, eine über-

Tab. 2 Übersicht über die Enzymaktivitäten von *S. multivorans*. Die Messungen erfolgten an ganzen und permeabilisierten Zellen. Die Aktivitäten sind in nkat g^{-1} Feuchtzellen bzw. in Prozent angegeben. Für die Berechnung der prozentualen Verteilungen wurden die Aktivitäten nach Permeabilisierung 100% gesetzt.

Substrate	Enzyme	Protamin				Lysozym			
			I _{EA}	I _%	P _{EA}		I _{EA}	I _%	P _{EA}
Pyruvat / Fumarat	Formiat-dehydrogenase	a	945	117	805	c	933	90	1035
		b	1554	125	1240	d	1165	80	1453
	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	a	165	18	923	c	124*	n.b.*	720
		b	181	25	741	d	57*	n.b.*	834
	PCE-Dehalogenase	a	2210	112	1981	c	879	34	2549
		b	1679	96	1753	d	1110	38	2958
	Fumaratreduktase	a	904	25	3645	c	453	10	4481
		b	496	15	3201	d	71	8	908
	Formiat-dehydrogenase	a	1474	88	1680	c	900	70	1290
		b	1066	96	1116	d	1171	95	1229
Pyruvat / PCE	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	a	6	3	196	c	184*	n.b.*	565
		b	61	38	160	d	206*	n.b.*	654
	PCE-Dehalogenase	a	215	36	604	c	361	20	1791
		b	256	24	1058	d	405	15	2744
	Fumaratreduktase	a	31	4	828	c	18	1	1539
		b	54	13	421	d	21	8	253
	Formiat-dehydrogenase	a	1084	88	1238	c	660	80	829
		b	1675	88	1899	d	744	78	954
	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase	a	39	9	458	c	48*	n.b.*	160
		b	71	24	300	d	51*	n.b.*	220
Formiat / PCE	PCE-Dehalogenase	a	555	40	1374	c	96	37	259
		b	898	38	2361	d	49	16	309
	Fumaratreduktase	a	51	4	1420	c	20	5	384
		b	35	2	1598	d	15	22	69

a-d: unabhängige Experimente, es wurden Zellen von verschiedenen Kultivierungen verwendet; EA: Enzymaktivitäten in nkat g^{-1} Feuchtzellen; I: intakte Zellen; P: permeabilisierte Zellen; I_%: Aktivität in Prozent; * Die Aktivität der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (ganze Zellen) wurde durch Saccharose im Messpuffer verdoppelt. Ein direkter Vergleich mit den Enzymaktivitäten permeabilisierter Zellen (Messpuffer ohne Saccharose) ist deshalb nicht möglich. Die prozentuale Verteilung wurde deshalb nicht bestimmt (n.b.).

wiegend zytoplasmatisch lokalisierte PCE-Dehalogenase. Unterschiedliche Ergebnisse wurden nur mit Zellen erhalten, die auf Pyruvat/Fumarat kultiviert worden waren. Mit Protamin wurde eine periplasmatische und mit Lysozym eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation der PCE-Dehalogenase festgestellt (Tab. 2).

3.1.2. Nachweis der PCE-Dehalogenase mit spezifischen Antikörpern

Die Lokalisationsstudien mittels enzymatischen Messungen sollten durch Westernblotanalysen unterstützt werden. Dazu wurden die Zellproben, welche auch für die Enzymmessungen Verwendung fanden, eingesetzt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung des Gesamtproteins und anschließendem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran, wurden beide Formen der PCE-Dehalogenase mit dem spezifischen Antikörper nachgewiesen. In Abbildung 2 ist exemplarisch ein solcher Westernblot gezeigt, der die Verteilung der PCE-Dehalogenase in Abhängigkeit der verwendeten Substrate darstellt.

In Abwesenheit von PCE liegt die Mehrheit des exprimierten Proteins in der unprozessierten Form, also vermutlich zytoplasmatisch, vor. Erst die Anwesenheit von PCE im Kulturmedium bewirkt eine Verschiebung zu Gunsten der prozessierten Form (vermutlich periplasmatisch). In Pyruvat/Fumarat-gewachsenen Zellen (Abb. 2, Spur 3) liegt nahezu die gesamte PCE-Dehalogenase unprozessiert vor. Das Verhältnis von unprozessiert zu prozessiertem Protein verschiebt sich in Pyruvat/PCE-gewachsenen Zellen zu Gunsten der prozessierten Form (~1:3; Abb. 2, Spur 4). Wurden die Zellen auf Formiat/PCE-Medium kultiviert, war nahezu keine unprozessierte PCE-Dehalogenase nachweisbar. Pyruvat/Fumarat/PCE-kultivierte Zellen zeigen eine Gleichverteilung des Enzyms. Die Verhältnisse zwischen unprozessiertem und prozessiertem Protein bei Lactat/Fumarat-kultivierten Zellen wurde mit 4:1 (Abb. 2, Spur 6) und bei Formiat/Fumarat-gewachsenen Zellen mit 2:1 (Abb. 2, Spur 7)

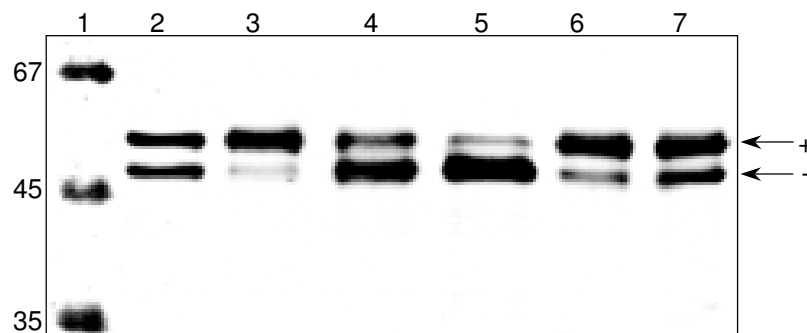


Abb. 2 Einfluss der Wachstumssubstrate auf die Prozessierung der PCE-Dehalogenase von *S. multivorans*. Zum Nachweis der PCE-Dehalogenase wurden enzymspezifische Antikörper eingesetzt. Je Spur wurde 1 µg Gesamtprotein (ganze Zellen) aufgetragen. Spur 1: Proteinstandard (kDa); Spur 2: Pyruvat/Fumarat/PCE; Spur 3: Pyruvat/Fumarat; Spur 4: Pyruvat/PCE; Spur 5: Formiat/PCE; Spur 6: Lactat/Fumarat; Spur 7: Formiat/Fumarat. Die Pfeile markieren die unprozessierte (+) und die prozessierte (-) PCE-Dehalogenase (John et al 2006).

abgeschätzt. Die Ergebnisse zeigen, dass PCE die Prozessierung der PCE-Dehalogenase beeinflusst.

Die Enzymaktivitäten von PceA wurden im Rohextrakt von den Kulturen Pyruvat/Fumarat (Abb. 2, Spur 3) und Formiat/PCE (Abb. 2, Spur 5) mit 26 nkat mg^{-1} und 11 nkat mg^{-1} bestimmt. Damit konnte das erste Mal bewiesen werden, dass auch die unprozessierte Form der Dehalogenase aktiv ist (John et al. 2006).

Der Einfluss von TCE als alternatives Substrat der PCE-Dehalogenase sowie von *cis*-DCE auf die Lokalisation der PCE Dehalogenase war ebenfalls von Interesse. Deshalb wurde der Organismus in Anwesenheit dieser Substrate über 7 Tage subkultiviert und die Verteilung der PCE-Dehalogenase im Westernblot untersucht. In Abbildung 3 ist der Westernblot zu diesem Versuch dargestellt. Da *cis*-DCE das Endprodukt der Dechlorierung von PCE ist und somit auf diesem Substrat kein Wachstum möglich ist, wurden zur besseren Vergleichbarkeit die Zellen alle auf Pyruvat/Fumarat kultiviert und zusätzlich mit PCE, TCE oder *cis*-DCE versetzt. Für eine bessere Übersicht im Westernblot wurde zusätzlich Gesamtprotein von Pyruvat/Fumarat- und Formiat/PCE-kultivierten Zellen aufgetragen.

TCE bewirkt ebenfalls wie PCE eine Induktion der Prozessierung der Dehalogenase. Hier konnte eine Verteilung von prozessiertem und unprozessiertem Enzym von ca. 1:2 festgestellt werden. Die Gesamtmenge der Dehalogenase scheint jedoch im Vergleich zur Kultur mit PCE geringer zu sein. Wurde der Organismus mit *cis*-DCE kultiviert, so verschwindet die Dehalogenase fast vollständig. Nur eine schwache Bande (prozessierte Form) konnte noch im Westernblot detektiert werden.

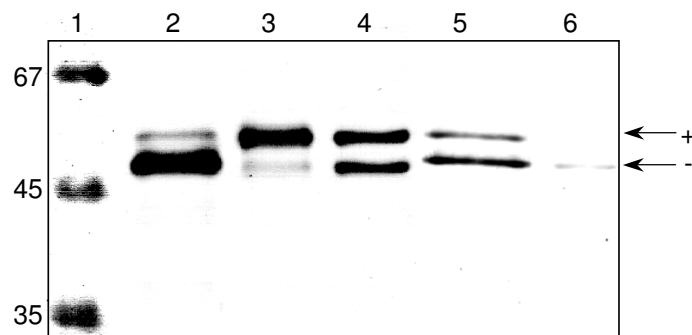


Abb. 3 Einfluss chlorierter Ethene auf die Prozessierung der PCE-Dehalogenase von *S. multivorans*. Zum Nachweis der PCE-Dehalogenase wurden enzyme-spezifische Antikörper eingesetzt. Je Spur wurde 1 μg Gesamtprotein (ganze Zellen) aufgetragen. Spur 1: Proteinstandard (kDa); Spur 2: Formiat/PCE; Spur 3: Pyruvat/Fumarat; Spuren 4-6: Pyruvat/Fumarat plus 4: PCE; 5: TCE; 6: *cis*-DCE. Die Pfeile markieren die unprozessierte (+) und die prozessierte (-) PCE-Dehalogenase.

3.1.3. Lokalisation der PCE-Dehalogenase in Gefrierbruchpräparaten nach Immunogoldmarkierung

Um die Ergebnisse der Westernblotanalysen abzusichern, wurden weitere Lokalisationsstudien durchgeführt. Hierfür wurde die Gefrierbruch-Elektronenmikroskopie ausgewählt. Während des Gefrierbruchs werden Lipiddoppelmembranen in die Einzelmembranen gespalten. Aufgrund der strukturellen Unterschiede der entstehenden Memranoberflächen kann im elektronenmikroskopischen Bild zwischen den verschiedenen Ansichten differenziert werden. Des weiteren ist mit dieser Methode eine Lokalisation von löslichem Protein im Zytoplasma bzw. frei im Medium vorliegendem Protein möglich (Pop et al. 2003).

Zur Detektion der PCE-Dehalogenase wurden im ersten Schritt die Replika mit dem PceA-spezifischen Antikörper markiert, der durch einen sekundären, goldmarkierten Antikörper erkannt wurde. Im elektronenmikroskopischen Bild wurden die markierten Enzymmoleküle als schwarze Punkte erkennbar. Um den Einfluss von PCE auf die Lokalisation der PCE-Dehalogenase zu untersuchen, wurden Pyruvat/PCE- und Formiat/PCE-gewachsene Zellen untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die auf Pyruvat/Fumarat kultiviert worden waren.

In Abbildung 4 ist eine Auswahl elektronenmikroskopischer Bilder gezeigt, die die Situationen unter den gewählten Wachstumsbedingungen exemplarisch wiedergeben. Pyruvat/Fumarat-gewachsene Zellen zeigten ein ungewöhnliches Bruchverhalten. Normalerweise brechen Gram-negative Zellen hauptsächlich in der zytoplasmatischen Membran. Auf dieser Substratkombination gewachsene Zellen brachen jedoch zu 90-95% in der äußeren Membran. Die in der Zytoplasmamembran gebrochenen Zellen zeigten eine Markierungsverteilung, die auf eine zytoplasmatisch-lösliche (Abb. 4 A, Cy; Abb. 5 A) bzw. zytoplasmatisch-membranassoziierte Lokalisation (Abb. 4 B, CM PF) schließen lässt. Nur sehr wenige Markierungen konnten auf der exoplasmatischen Seite detektiert werden (Abb. 4 C, CM EF). Diese Beobachtung steht mit den Ergebnissen der Westernblotanalysen im Einklang. Obwohl die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (zweidimensional) eine Quantifizierung des löslichen (zytoplasmatischen) Enzyms nicht erlauben, zeigen die Brüche durch das Zytoplasma (Abb. 4 A (Cy), Abb. 5 A), dass der Hauptteil der PCE-Dehalogenase löslich ist.

Die Markierung in Pyruvat/PCE-gewachsenen Zellen wurde zum größten Teil auf der exoplasmatischen Seite der Zytoplasmamembran detektiert (Abb. 4 D, CM EF), was für eine periplasmatische Lokalisation der PCE Dehalogenase spricht. Das Wachstum der Zellen auf Formiat/PCE ist nur möglich, wenn die Reduktion von PCE an die Energiekonservierung gekoppelt ist (Dehalorespiration). Diese Zellen zeigten nur Markierungen auf der exoplasmatischen Seite der Zytoplasmamembran (CM EF; Abb. 4 E, linke Zelle). Im Zytoplasma und auf der zytoplasmatischen Seite

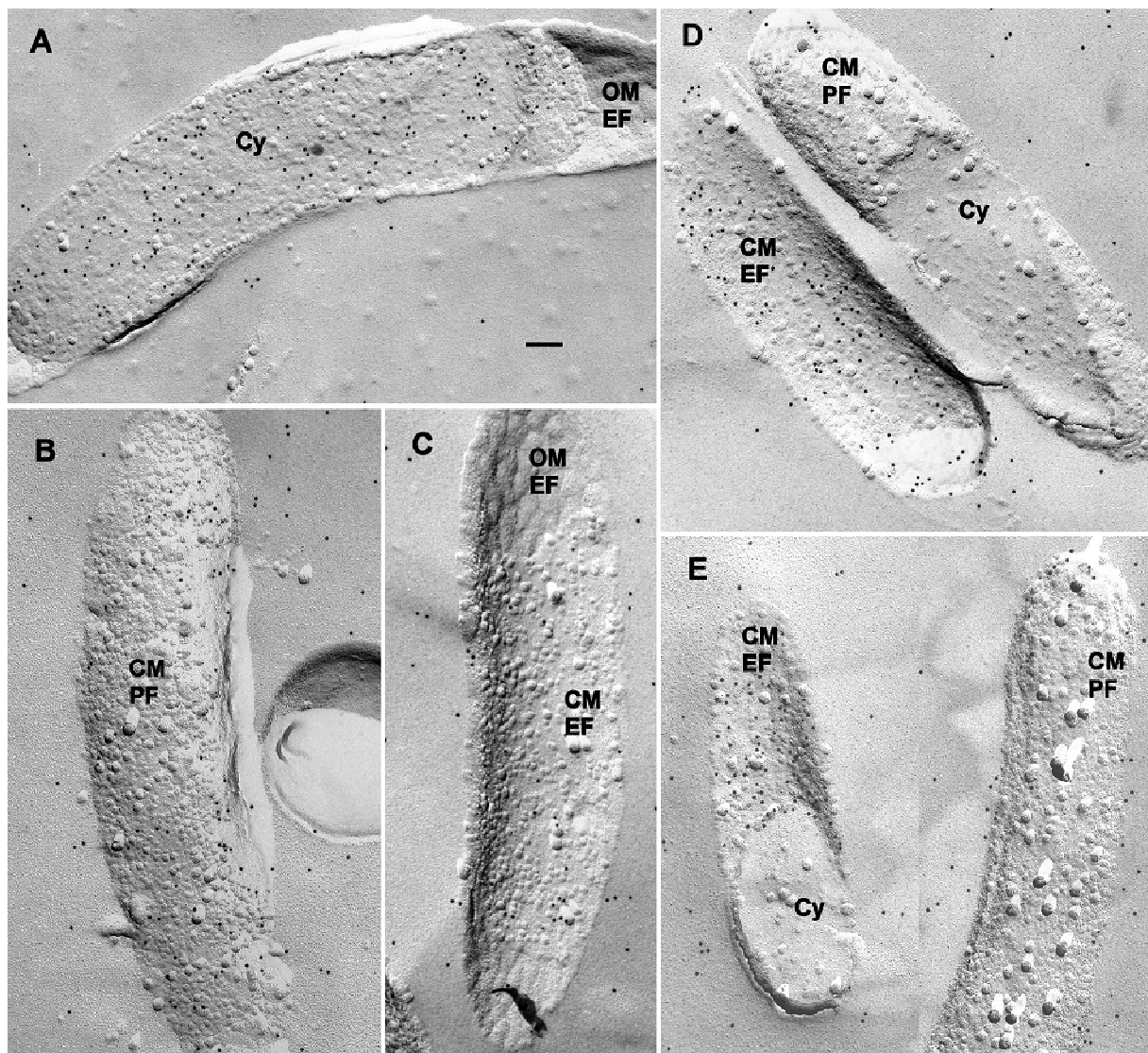


Abb. 4 Lokalisation der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* in Abhängigkeit vom Substrat durch Immunogoldmarkierung. Die Zellen wurden auf Pyruvat/Fumarat (A-C), Pyruvat/PCE (D) oder Formiat/PCE (E) kultiviert. Nach dem Gefrierbruch wurden die Replika mit dem spezifischen Antikörper für die PCE-Dehalogenase und dem goldmarkierten sekundären Antikörper markiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen Querbrüche durch das Zytosol (Cy), die protoplasmatische Bruchfläche (innere Hälfte) der Zytoplasmamembran (CM PF), die exoplasmatische Bruchfläche (äußere Hälfte) der Zytoplasmamembran (CM EF), sowie die exoplasmatische Bruchfläche (äußere Hälfte) der äußeren Membran (OM EF). Der Maßstab (in A) entspricht 100 nm (John et al. 2006).

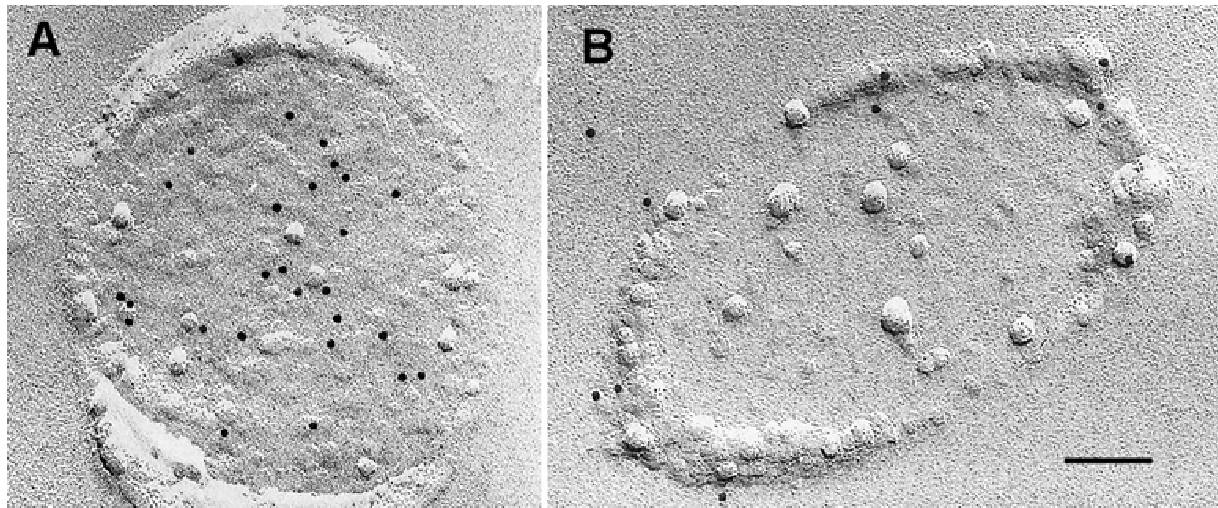


Abb. 5 Lokalisation der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* durch Immunogoldmarkierung in Abhängigkeit vom Substrat. Die Zellen wurden auf Pyruvat/Fumarat (A) oder Formiat/PCE (B) kultiviert. Die Aufnahmen zeigen einen Querbruch durch die Zelle vergleichbar mit Präparaten der Dünnschnitt-Elektronenmikroskopie. Goldmarkierung im Cytoplasma (A) oder an der Membran (B). Der Maßstab (in B) entspricht 100 nm.

der Zytoplasmamembran wurden hingegen nur vereinzelt Markierungen detektiert (CM PF; Abb. 4 E, rechte Zelle).

In Abbildung 5 sind quergebroschene Zellen dargestellt. Aus dieser Abbildung geht eindeutig hervor, dass erst durch Anwesenheit des Substrats PCE der Transport der PCE-Dehalogenase an die Membran erfolgt.

Diese Ergebnisse führten zu der Schlussfolgerung, dass die PCE-Dehalogenase ein periplasmatisch membranassoziiertes Protein ist, wenn der Organismus zur Energiegewinnung auf die reduktive Dechlorierung angewiesen ist. Die Ergebnisse wurden von zwei unabhängigen Zellkulturen je Substratkombination erhalten. Die Markierungen pro Fläche in Abhängigkeit des Wachstumssubstrats sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3 Auszählung der PCE-Dehalogenase nach Immunogoldmarkierung in Gefrierbrüchen von *S. multivorans*.

Substrate	Goldpartikel μm^{-2} / Goldpartikel gezählt	
	CM EF	CM PF
Pyruvat/Fumarat	54/158	114/115
Pyruvat/PCE	249/989	18/72
Formiat/PCE	341/1066	18/53

CM EF und CM PF: die exoplasmatische und protoplasmatische Bruchfläche der Zytoplasmamembran.

3.2. Nachweis der Expression von PceB

Die beiden Gene im Operon der PCE-Dehalogenase (*pceAB*) haben 4 Nukleotide gemeinsam. Diese Überlappungsbereiche sind für funktionell gekoppelte Proteine beschrieben. In früheren Versuchen wurde die Kotranskription mit RT-PCR nachgewiesen. Die Expression von *pceB* in *S. multivorans* konnte bis jetzt trotz intensiver Bemühungen noch nicht gezeigt werden. Die Funktion als mutmaßlicher Membrananker für die Dehalogenase ist daher spekulativ. Aufgrund eines fehlenden genetischen Systems für *S. multivorans* sollte die translationale Kopplung von *pceAB* in *E. coli* gezeigt werden.

Dazu wurden Fusionsplasmide konstruiert, um eine erfolgreiche Expression der Proteine durch Messung der β -Galactosidaseaktivität (C-terminaler Fusionspartner) in *E. coli* nachzuweisen. Das Fusionsgen (*lacZ α*) wurde so eingebaut, dass es mit der Dehalogenase (PceA-LacZ α) bzw. mit dem mutmaßlichen Membrananker PceB (PceB-LacZ α) fusionierte. Im letzten Fall wurde nach Induktion die PCE-Dehalogenase sowie bei kotranslationaler Kopplung das Fusionsprotein PceB-LacZ α exprimiert. Nach Induktion erfolgte die Ablagerung der heterologen Proteine in Einschlusskörperchen. Somit konnte die Quantifizierung der induzierten Proteine nicht über die Messung der Aktivität der β -Galactosidase erfolgen. Die Auswertung erfolgte deshalb durch Intensitätsbestimmungen der induzierten Proteine des in der SDS-

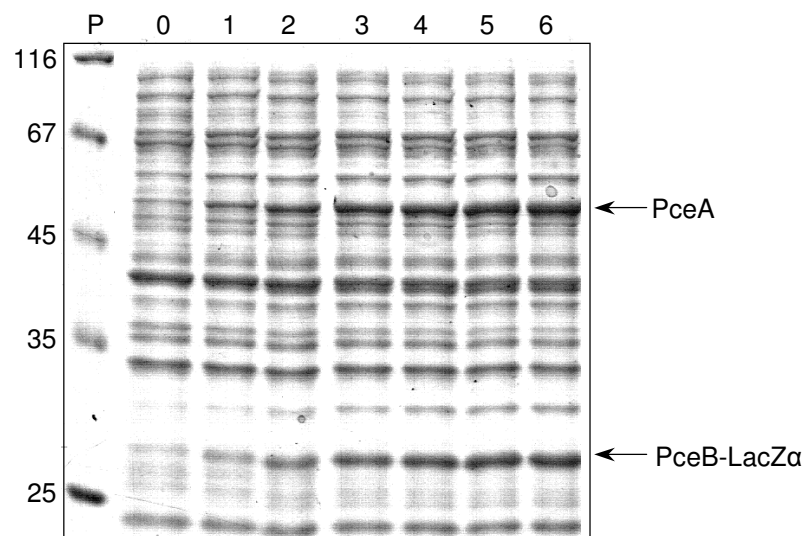


Abb. 6 Nachweis der translationalen Kopplung von *pceAB* in *E. coli* TB1. SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung. Es wurden 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. P: Proteinstandard (kDa); 0: vor Induktion mit IPTG; 1-6: Proben 1-6 Stunden nach Induktion mit IPTG.

PAGE aufgetrennten Gesamtproteins mit dem Programm Image J (Abramoff et al. 2004). In Abbildung 6 ist exemplarisch eine SDS-PAGE von einem Induktionsversuch dargestellt. Es ist die Entstehung und Zunahme von zwei Proteinbanden mit den erwarteten molaren Massen von ~53 kDa (PceA) sowie ~30 kDa (PceB-LacZ α) in Abhängigkeit der Induktionszeit zu sehen.

Die berechneten Intensitätswerte sind in Abbildung 7 über die Zeit grafisch aufgetragen. Aufgrund der Größenunterschiede der beiden betrachteten Proteine ergibt sich ein Unterschied in der Intensität. Deshalb wurden die Intensitätswerte des kleineren Proteins (PceB-LacZ α) mit dem Quotient aus den molaren Massen ($53/30 = 1,7$) multipliziert und somit korrigiert.

Die Untersuchungen zeigten, dass die Proteine PceA und PceB(-LacZ α) in *E. coli* im Verhältnis von ca. 1:1 koexprimiert wurden.

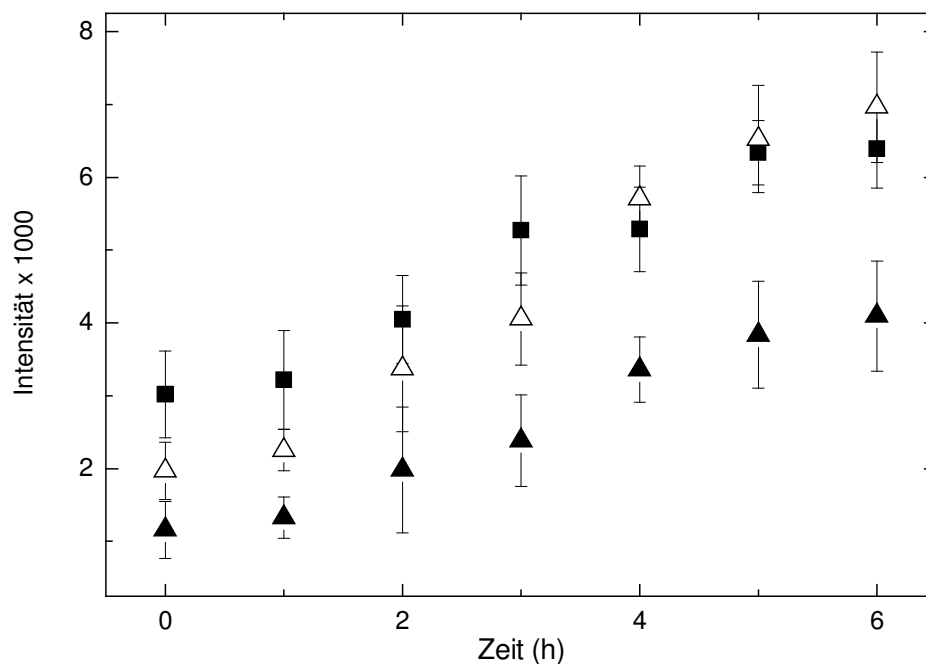


Abb. 7 Intensitätszunahme der mit IPTG induzierten Proteine in *E. coli* über die Zeit. Die Auswertung der SDS-PAGE erfolgte mit dem Programm Image J (Abramoff et al. 2004). PceA (■); PceB-LacZ α (▲); korrigierte Intensitäten von PceB-LacZ α (Δ).

3.3. Expression der PCE-Dehalogenase

Die PCE-Dehalogenase von *S. multivorans* wurde aus Zellen isoliert, die auf Pyruvat/Fumarat kultiviert worden waren (Neumann et al. 1996). Das Enzym wird also auch in Abwesenheit des Substrats exprimiert. Um zu untersuchen, über welchen Zeitraum der Organismus das Enzym auch in Abwesenheit seines Substrates exprimiert, wurden die Zellen auf Pyruvat/Fumarat-Medium subkultiviert. Dazu wurden die Zellen täglich auf neues Medium überimpft. Von jeder fünften Subkultur (SK) wurden Zellen geerntet, die für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der PCE-Dehalogenase und für Westernblotanalysen Verwendung fanden.

Nach Herstellung des Rohextraktes wurde die Aktivität der PCE-Dehalogenase im Enzymtest photometrisch bestimmt. Die spezifischen Aktivitäten sind in der Abbildung 8 dargestellt. Eine Abnahme der Dehalogenaseaktivität wurde erst ab SK15 festgestellt. Durch weitere Kultivierung auf Pyruvat/Fumarat nahm die Aktivität stetig ab, bis sie nach 35 Subkultivierungen (fast) nicht mehr nachweisbar war. Die Detektion von PceA im Westernblot (Abb. 9) bestätigte diese Beobachtung. Hier war eine Abnahme des Enzyms erst nach 20 Subkultivierungen (Spur 6) zu beobachten. Sowohl im Westernblot (Abb. 9) als auch im Enzymtest (Abb. 8) war die PCE-

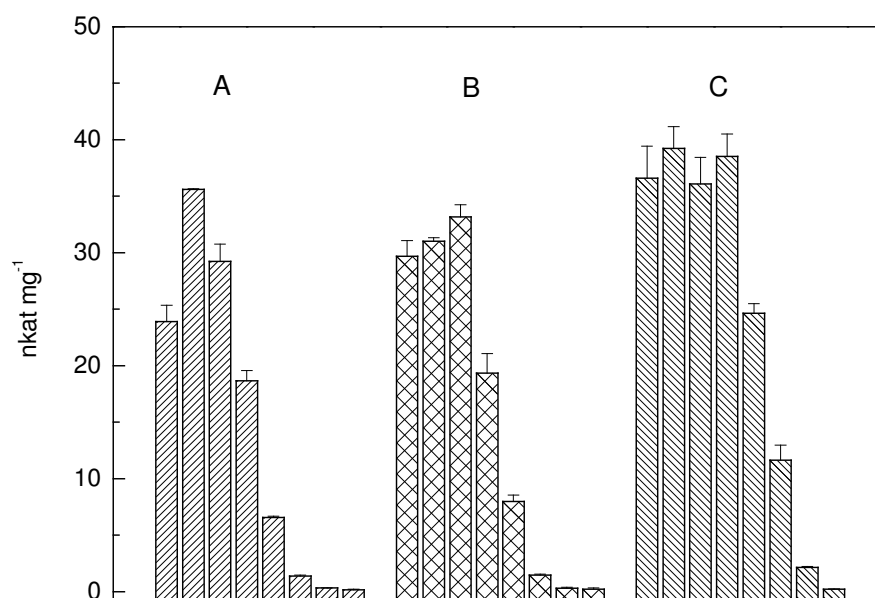


Abb. 8 Abnahme der spezifischen Aktivität der PCE-Dehalogenase in *S. multivorans* während der (Sub)Kultivierung auf Pyruvat/Fumarat-Medium. Es wurden drei unabhängige Subkultivierungsexperimente (A-C) durchgeführt. Für jedes Experiment ist die Aktivität der PCE-Dehalogenase von den Subkulturen 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 dargestellt.

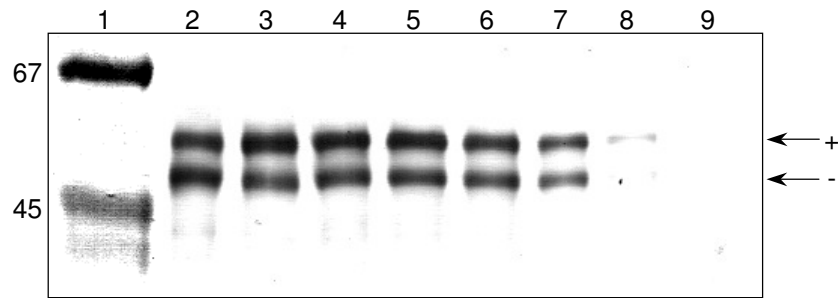


Abb. 9 Detektion der PCE-Dehalogenase in Pyruvat/Fumarat-subkultivierten Zellen von *S. multivorans* im Westernblot. Zum Nachweis der PCE-Dehalogenase wurden enzyme-spezifische Antikörper eingesetzt. Je Spur wurde 1 µg lösliches Protein aufgetragen. Spur 1: Proteinstandard (kDa); Spuren 2-9: Subkulturen 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35. Die Pfeile markieren die unprozessierte (+) und die prozessierte (-) PCE-Dehalogenase.

Dehalogenase ab SK35 nicht mehr nachweisbar.

Die Expression der Dehalogenase in Abwesenheit des Substrats wurde erst sehr spät herunterreguliert. Die ständige Kultivierung auf Pyruvat/Fumarat hatte im gleichen Zeitraum eine Zunahme der Aktivität der Fumaratreduktase zur Folge, die sich in der Subkultur 35 im Vergleich zur Aktivität zu Beginn des Versuchs verdoppelt hatte (Abb. 10).

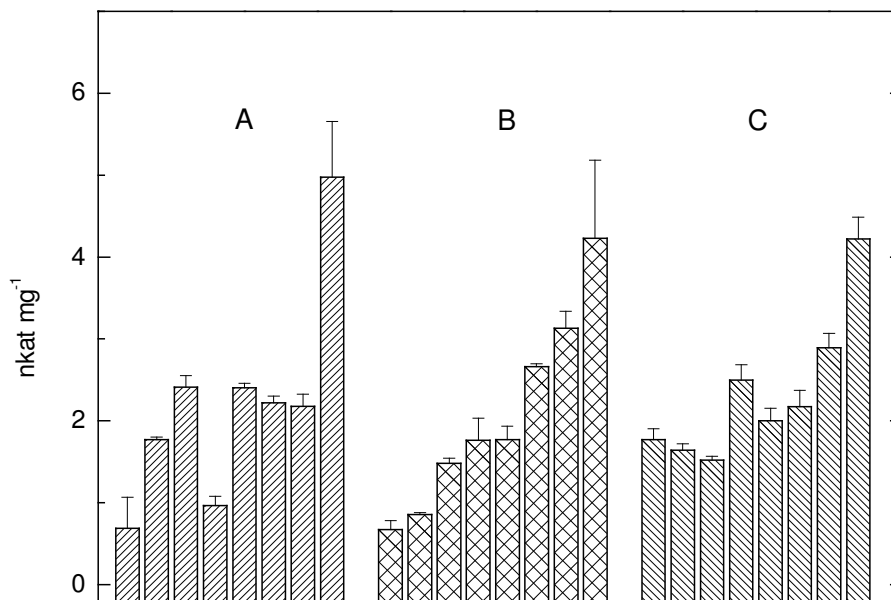


Abb. 10 Zunahme der spezifischen Aktivität der Fumaratreduktase in *S. multivorans* während der (Sub)Kultivierung auf Pyruvat/Fumarat-Medium. Es wurden drei unabhängige Subkultivierungsexperimente (A-C) durchgeführt. Für jedes Experiment ist die spezifische Aktivität der Fumaratreduktase von den Subkulturen 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 dargestellt.

3.3.1. Transkription der PCE-Dehalogenase

Die Abnahme bis hin zum Verlust der PCE-Dehalogenaseaktivität während der Subkultivierung auf Pyruvat/Fumarat könnte in der Einstellung der Expression des Enzyms oder aber auch in der Einstellung bzw. Abnahme der Transkription des Gens begründet liegen. Deshalb wurde ein RT-PCR-Experiment mit einer PceA-negativen (SK55) und PceA-positiven Kultur (SK7) von *S. multivorans* durchgeführt (Abb. 11).

In der RT-PCR konnte ein Amplifikat mit der erwarteten Größe von 339 bp nachgewiesen werden (Abb. 11 Spuren 3 und 5). Wie in Abbildung 11 eindeutig zu erkennen ist, ist die Transkriptmenge der PCE-Dehalogenase in der PceA⁻-Kultur viel niedriger als in der PceA⁺-Kultur. Da für diese Untersuchung keine quantitative RT-PCR durchgeführt wurde, konnte eine Aussage über die Größenordnung der Abnahme der Transkriptmenge in der PceA-negativen Kultur nicht getroffen werden.

Zum Nachweis des *pceA*-Gens wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, bei der gleiche Mengen Zellmaterial (entsprechend 10 ng Protein) als Template eingesetzt wurden. In diesem Versuch wurde überprüft, ob der Verlust der PCE-Dehalogenaseaktivität der PceA⁻-Kultur mit dem Verlust des Gens zu erklären ist. In der PCR konnte mit beiden (PceA⁺- und PceA⁻-) Kulturen ein Produkt vergleichbarer Intensität amplifiziert werden, was eine identische Menge an Ausgangsmaterial (*pceA*-Gen) impliziert (Daten nicht gezeigt).

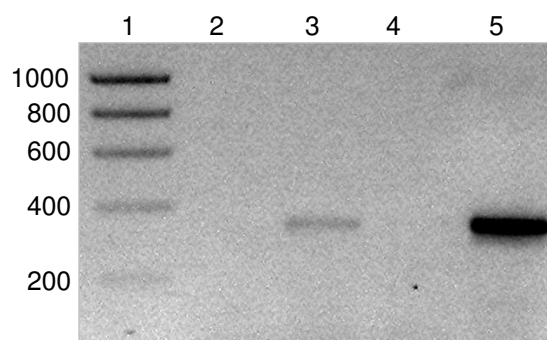


Abb. 11 RT-PCR mit PceA-spezifischen Primern. Spur 1: DNS-Marker (bp); Spuren 2 und 3: PceA-negative Zellen (Subkultur 55); Spuren 4 und 5: PceA-positive Zellen (Subkultur 7); Spuren 2 und 4: Kontrolle ohne reverse Transkription; Spuren 3 und 5: RT-PCR. Die Auftrennung erfolgte im 1% TAE-Agarosegel.

3.3.2. Vergleich des Corrinoidgehalts PceA-positiver/-negativer Kulturen

Aufgrund fehlender PCE-Dehalogenase in der entsprechenden Kultur (SK55) wurde angenommen, dass auch die B₁₂-Synthese davon beeinflusst sein könnte. Deshalb wurde von PceA⁺- und PceA⁻-Zellen eine Corrinoideextraktion durchgeführt, um die Extrakte vergleichend per HPLC zu analysieren. Der Vergleich der Spektren der isolierten Corrinoide zeigte, dass die PceA⁻-Zellen (SK55) einen geringeren Corrinoidgehalt im Vergleich zu den PceA⁺-Zellen (SK7) aufwiesen. Des weiteren konnte eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Corrinoideextrakts subkultivierter Zellen (PceA⁻, SK55) im längerwelligen Bereich beobachtet werden (Abb. 12).

Zur Abschätzung des spezifischen Kofaktors (Norpseudovitamin-B₁₂) der PCE-Dehalogenase aus PceA-positiven/-negativen Zellen wurden die isolierten Corrinoideextrakte mittels HPLC aufgetrennt (Abb. 13). Anhand der Retentionszeit sowie der Wechselzahl für die abiotische Umsetzung von Trichloracetat (Neumann et al. 2002; Siebert 2002) konnte das Norpseudovitamin-B₁₂ im HPLC-Elutionsprofil identifiziert werden. Die Unterschiede im Norpseudovitamin-B₁₂-Gehalt wurden anhand der Flä-

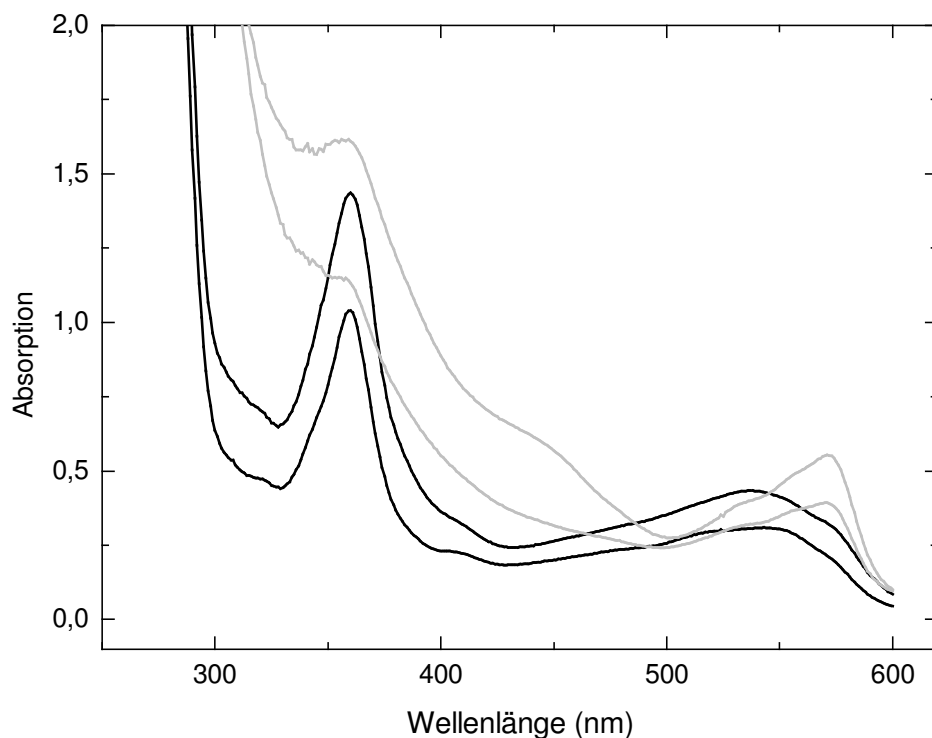


Abb. 12 Absorptionsspektren der Corrinoideextrakte aus *S. multivorans*. PceA-positiv (schwarz): 7 Subkultivierungen auf Pyruvat/Fumarat; Corrinoide-Extrakt 1:100 in Wasser. PceA-negativ (grau): 55 Subkultivierungen auf Pyruvat/Fumarat; Corrinoide-Extrakt 1:10 in Wasser. Die Spektren stammen von jeweils zwei unabhängig gewonnenen Corrinoideextrakten.

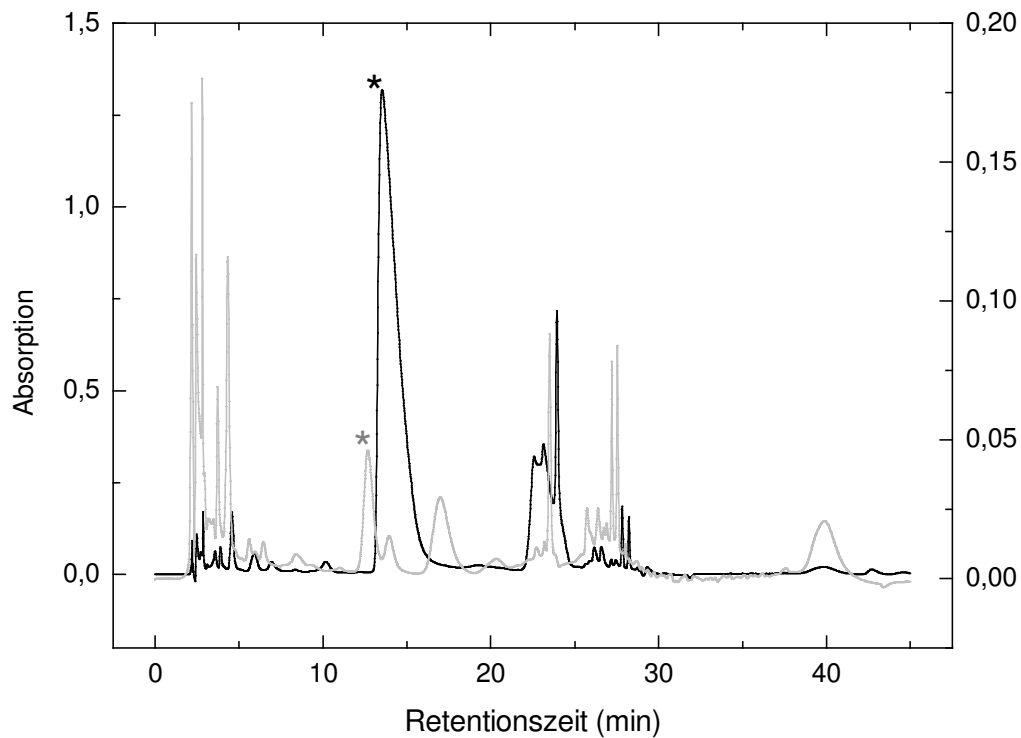


Abb. 13 Quantifizierung des Norpseudovitamin-B₁₂ im HPLC-Elutionsprofil. Das Elutionsprofil wurde bei 360 nm aufgenommen. Die Norpseudovitamin-B₁₂-Peaks sind mit einem Stern (*) markiert. Es wurden die Corrinoideextrakte von PceA-positiven Zellen (schwarz): 7 Subkultivierungen auf Pyruvat/Fumarat (linke y-Achse) sowie PceA-negativen Zellen (grau): 55 Subkultivierungen auf Pyruvat/Fumarat (rechte y-Achse) analysiert.

chenunterschiede im HPLC-Elutionsprofil ermittelt (Tab. 4). Es konnte ein mittleres Verhältnis im Norpseudovitamin-B₁₂-Gehalt zwischen PceA⁺- und PceA⁻-Zellen von ca. 60:1 bestimmt werden. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Synthese von Norpseudovitamin-B₁₂ und die Synthese der PCE-Dehalogenase einer gemeinsamen Kontrolle, eventuell durch einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor, unterliegen

Tab. 4 Peakflächen von Norpseudovitamin-B₁₂ im HPLC-Elutionsprofil der Corrinoideextrakte. Die Corrinoideextrakte (50 µl) subkultivierter Zellen mit und ohne exprimierter PCE-Dehalogenase wurden per HPLC analysiert und die Flächen der erhaltenen Peaks miteinander verglichen. Der Mittelwert der Quotienten PceA⁺/PceA⁻ beträgt 62.

	Rt	Fläche
1) PceA ⁻	12,68	913806
2) PceA ⁻	13,53	1828415
3) PceA ⁺	13,53	65772435
4) PceA ⁺	11,69	84203334

Rt: Retentionszeit in Minuten

3.3.3. Induktion der PCE-Dehalogenase in der PceA⁻-Kultur

Um die Induzierbarkeit der PCE-Dehalogenase durch ihr Substrat PCE zu überprüfen, wurde eine Pyruvat/Fumarat-Vorkultur (SK56) auf Wasserstoff/PCE- und Wasserstoff/Formiat/PCE-Medium überimpft. Das Wachstum wurde über die Zunahme des Proteingehalts verfolgt. Die Quantifizierung der chlorierten Ethene (PCE, TCE, *cis*-DCE) erfolgte mittels Gaschromatographie. Zusätzlich wurde PceA im Westernblot mit den spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Im Westernblot (Abb. 14, A und B) war die PCE-Dehalogenase erst nach 54 bzw. 56 Stunden nach Inokulation der Kultur nachweisbar. Etwas zeitverzögert war

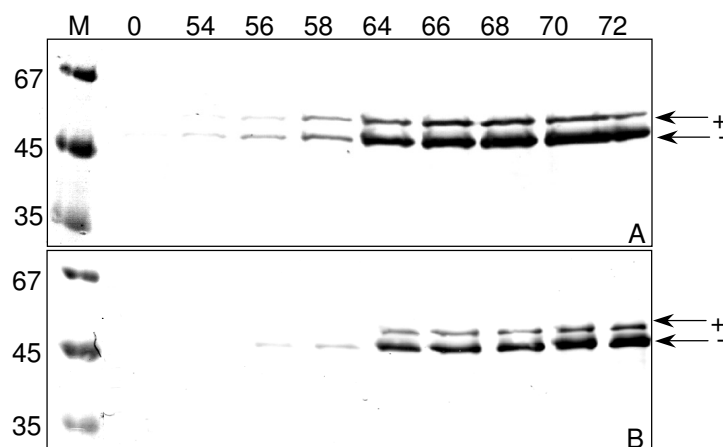


Abb. 14 Nachweis der Induktion der PCE-Dehalogenase im Westernblot. Je Spur wurde 1 µg Gesamtprotein (ganze Zellen) aufgetragen. A: Wasserstoff/PCE; B: Wasserstoff/Formiat/PCE; M: Proteinstandard (kDa); Ziffern über den Spuren entsprechen der Kultivierungsdauer (h) nach Beimpfen. Die Pfeile markieren die unprozessierte (+) und die prozessierte (-) PCE-Dehalogenase.

auch das Produkt (*cis*-DCE) nachweisbar (Abb. 15). Aufgrund der gewählten Substratkombinationen war ein Wachstum nur durch reduktive Dechlorierung möglich. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, erfolgte das Wachstum der Kulturen erst nach Induktion der PCE-Dehalogenase. Die Induktionsversuche wurden wiederholt durchgeführt und konnten reproduziert werden. Die Induktion von PceA erfolgte auch auf Pyruvat/PCE-Medium. Wasserstoff ist in der Natur vermutlich der natürliche Elektrodonor für die reduktive Dechlorierung. Deshalb wurde auch in Anwesenheit von alternativen Elektronendonoren Wasserstoff zugesetzt. In Kontrollexperimenten ohne Wasserstoff erfolgte die Induktion von PceA auf Formiat/PCE- und Pyruvat/PCE-Medium ca. 24 Stunden früher als in den Kulturen mit Wasserstoff (Daten nicht gezeigt). Mit Kohlenmonoxid in der Gasphase wurde die PCE-Dehalogenase, unabhängig von den Substratkombinationen, nicht induziert (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen der Experimente konnte die Ursache für den Effekt von Wasserstoff und Kohlenmonoxid auf die Induktion von PceA nicht aufgeklärt werden.

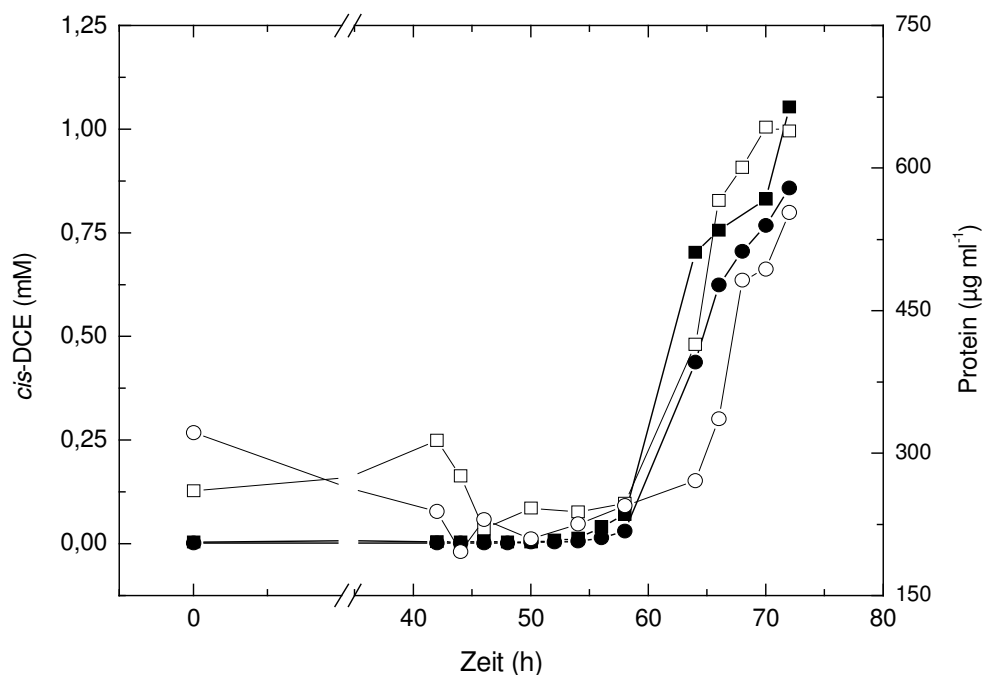


Abb. 15 Wachstum und Bildung von *cis*-DCE nach Induktion der PCE-Dehalogenase in einer PceA⁻-Kultur. Die Vorkultur wurde auf Pyruvat/Fumarat (SK56) kultiviert und auf folgende Substratkombinationen umgesetzt: Wasserstoff/PCE (■,□); Wasserstoff/Formiat/PCE (●,○); schwarze Symbole = *cis*-DCE; leere Symbole = Wachstum (Proteingehalt).

3.4. Vergleich von PceA-positiven und -negativen Kulturen

3.4.1. Unterschiede in der Zellstabilität

Während der Subkultivierung (SK) von *S. multivorans* über längere Zeit auf Pyruvat/Fumarat wurde festgestellt, dass die Zellen nach Verlust der PCE-Dehalogenaseaktivität auf dieser Substratkombination nicht so schnell lysierten wie Zellen mit exprimierter Dehalogenase. In Abbildung 16 ist ein solcher Wachstumsversuch dargestellt. Wie daraus ersichtlich wird, hat die PceA⁺-Kultur in Abwesenheit von PCE eine kurze stationäre Phase und stirbt dann sehr schnell ab. Wurde der Kultur neben Pyruvat/Fumarat zusätzlich PCE gegeben, beträgt die Sterberate nur ein Zehntel im Vergleich zur Kultur ohne PCE. Die subkultivierten Zellen ohne aktive Dehalogenase (SK121) haben nach Erreichen der maximalen optischen Dichte eine mehr als doppelt so lange stationäre Phase als die Kultur mit aktiver Dehalogenase ohne PCE. Am Ende des Versuchs hatten die beiden Kulturen ohne PCE im Medium eine optische Dichte in der gleichen Größenordnung. Im Vergleich dazu hatte die Kultur mit PCE eine um den Faktor zwei höhere optische Dichte.

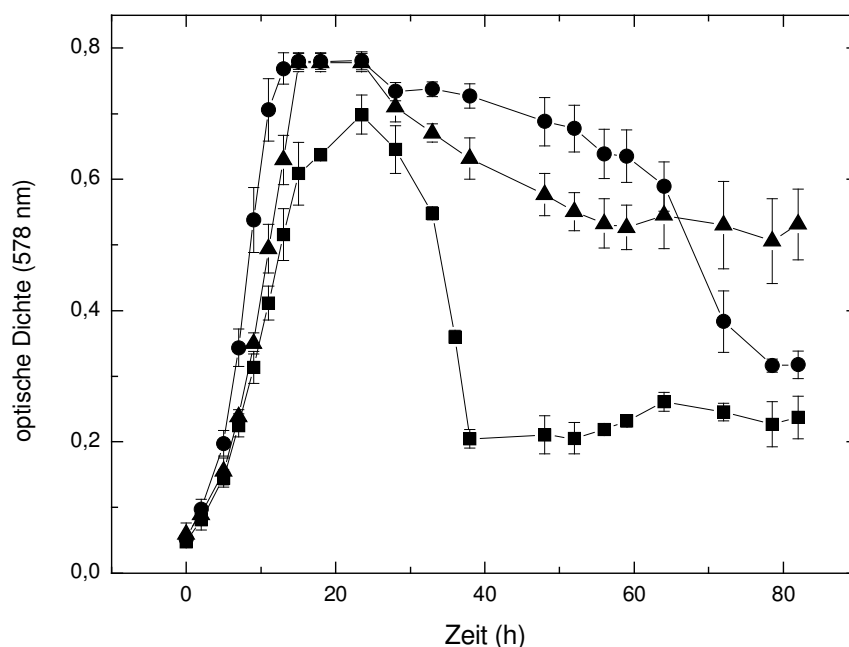


Abb. 16 Einfluss der Subkultivierung (SK) von *S. multivorans* auf Pyruvat/Fumarat-Medium auf die Stabilität der Zellen. Es sind die Wachstumskurven von Pyruvat/Fumarat SK7 (■), Pyruvat/Fumarat/PCE SK7 (▲) sowie Pyruvat/Fumarat SK121 (●) gezeigt. Die Standardabweichungen stammen von 3 unabhängigen Wachstumsversuchen je Kultur. Hinter den Substratkombinationen steht die Anzahl (X) der Subkultivierungen (SK).

Um den Einfluss von PCE auf die Stabilität der Zellen besser demonstrieren zu können, wurde die Kultur Pyruvat/Fumarat SK121 wieder auf Pyruvat/PCE umgesetzt, um die PCE-Dehalogenase zu induzieren. Danach erfolgte wiederum die Subkultivierung auf Pyruvat/Fumarat in An- und Abwesenheit von PCE für 7 Tage. Die Kultur mit PCE sollte wieder stabil sein, wohingegen bei der Kultur ohne PCE eine schnelle Absterbephase erwartet wurde. In Abbildung 17 sind die Wachstumskurven dieses Versuchs grafisch dargestellt. Die Kultur mit PCE ist über einen sehr langen Zeitraum stabil. Eine Absterbephase ist im betrachteten Zeitraum nicht eingetreten. In Abwesenheit von PCE verhielt sich die Kultur nicht wie erwartet, sondern wie die PceA⁻-Kultur nach 121 Subkultivierungen auf Pyruvat/Fumarat. Um sicher zu sein, dass die PCE-Dehalogenase auch wirklich induziert worden war, wurde ein Western-blot durchgeführt. Sie konnte sowohl in der Kultur nach Induktion auf Pyruvat/PCE als auch in der Kultur auf Pyruvat/Fumarat/PCE nachgewiesen werden. In Abwesenheit von PCE war die PCE-Dehalogenase schon nach einer Kultivierung auf Pyruvat/Fumarat nicht mehr nachweisbar. Somit lässt sich die Beobachtung mit dem Fehlen von PceA erklären.

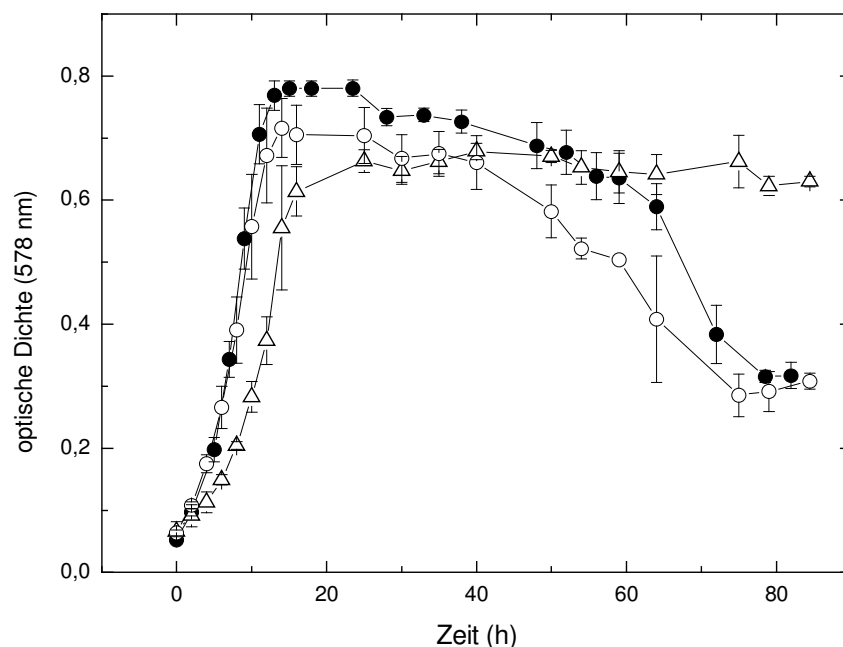


Abb. 17 Einfluss von PCE auf die Stabilität der Zellen nach Induktion der PCE-Dehalogenase in einer PceA⁻-Kultur. Die PCE-Dehalogenase der PceA⁻-Kultur wurde durch Kultivierung auf Pyruvat/PCE induziert. Danach wurde die Kultur wieder auf Pyruvat/Fumarat in Ab- und Anwesenheit von PCE für 7 Tage subkultiviert. Pyruvat/Fumarat SK121 (●); induzierte Kulturen auf Pyruvat/Fumarat SK121-i-7 (○) und Pyruvat/Fumarat/PCE SK121-i-7 (Δ). Die Standardabweichungen stammen von 3 unabhängigen Wachstumsversuchen je Kultur. Hinter den Substratkombinationen steht die Anzahl (X) der Subkultivierungen (SK).

Zu Beginn der Absterbephase hatten alle Kulturen Fumarat verbraucht. Lediglich Pyruvat war noch in geringen Konzentrationen im Medium vorhanden (nicht gezeigt). Der Verbrauch von PCE wurde ebenfalls verfolgt. In den Abbildungen 18 und 19 sind der Abbau von PCE (TCE) sowie die Bildung von *cis*-DCE dargestellt. Die

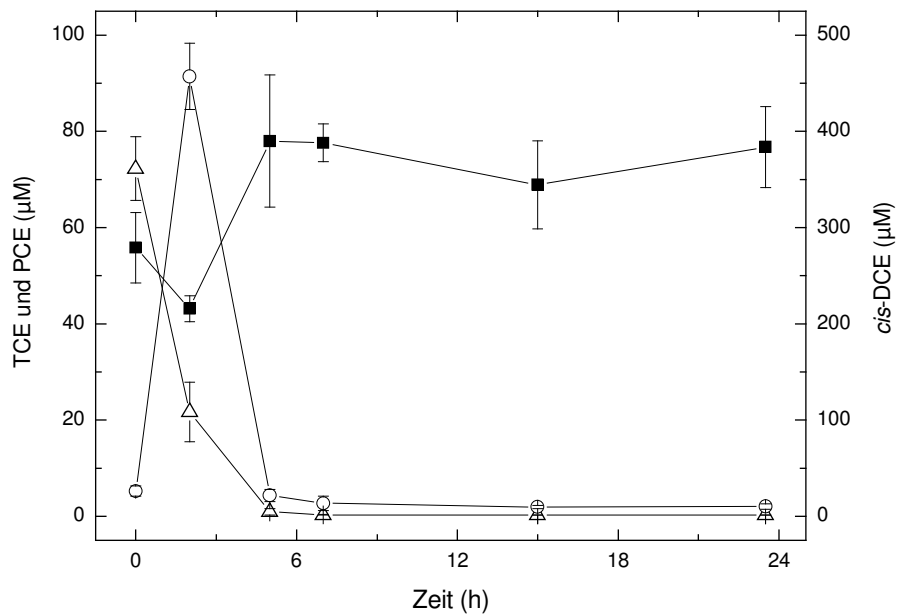


Abb. 18 Nachweis der Dechlorierung von PCE über TCE zu *cis*-DCE durch die Kultur Pyruvat/Fumarat/PCE SK7 (Abb. 16). PCE (Δ); TCE (○) und *cis*-DCE (■). Die Standardabweichungen sind das Resultat von 3 unabhängigen Kulturen.

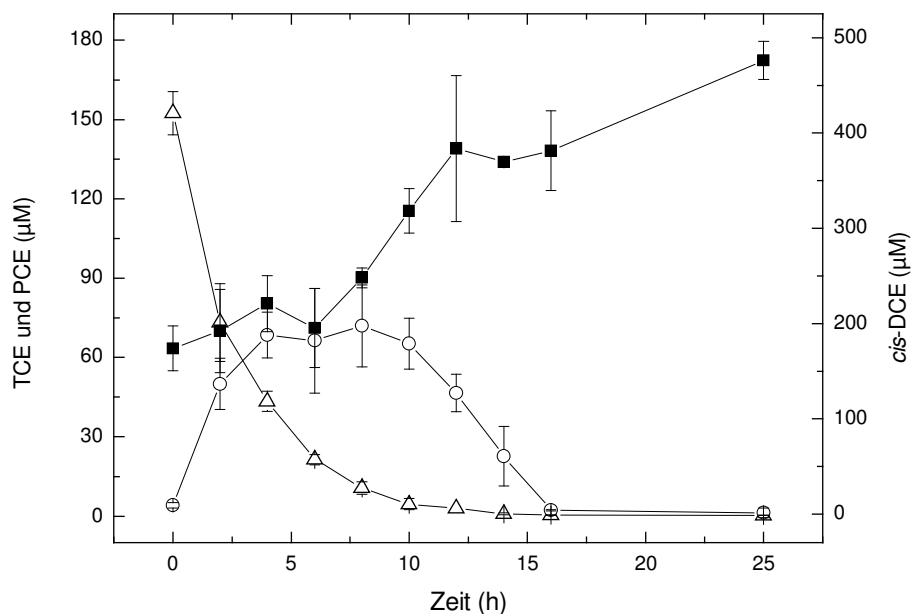


Abb. 19 Nachweis der Dechlorierung von PCE über TCE zu *cis*-DCE durch die Kultur Pyruvat/Fumarat/PCE SK121-i-7 (Abb. 17). PCE (Δ); TCE (○) und *cis*-DCE (■). Die Standardabweichungen sind das Resultat von 3 unabhängigen Kulturen.

hohen *cis*-DCE-Konzentrationen zum Zeitpunkt Null stammen von der Vorkultur, die mit 5 mM PCE (in Hexadekan) kultiviert wurde. Für den Hauptversuch wurde das PCE mit einer Konzentration von 100-150 μ M in das Medium über Nacht eingeschüttelt. Die über 7 Tage auf Pyruvat/Fumarat/PCE (SK7) subkultivierten Zellen bauten das PCE sofort nach dem Beimpfen innerhalb von 5 Stunden vollständig zu *cis*-DCE ab (Abb. 18). Der Abbau von PCE durch die induzierte Kultur (SK121-i-7) war erst nach 10 Stunden abgeschlossen. Das dabei entstehende TCE akkumulierte bis zu diesem Zeitpunkt in der Kultur und wurde erst nach dem Verbrauch von PCE vollständig zu *cis*-DCE umgesetzt (Abb. 19).

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der Wachstumsversuche zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass die Dauer der stationären Phasen bei den PceA⁺-Kulturen unbeeinflusst von der An- oder Abwesenheit von PCE war. In Anwesenheit von PCE betrug die Sterberate jedoch nur ein Zehntel im Vergleich zur Kultur ohne PCE. Die über 121 Tage auf Pyruvat/Fumarat subkultivierten Zellen (PceA-negativ) hatten eine mehr als doppelt so lange stationäre Phase als die PceA-positiven Zellen ohne Subkultivierung. Die Zellen nach Induktion von PceA zeigten im Experiment in Anwesenheit von PCE auch 100 Stunden nach Beginn des Versuchs keine Absterbephase.

Tab. 5 Vergleich der Stationär- und Absterbephasen von *S. multivorans* in Abhängigkeit der Dauer der Subkultivierung auf Pyruvat/Fumarat. Die Kulturen sind auf Pyruvat/Fumarat mit oder ohne PCE subkultiviert worden (Abb. 16 und 17).

Kultur	PceA	stationäre Phase (h)	Sterberate (OD ₅₇₈ h ⁻¹)
Py/Fu SK7	+	10	-0,068
Py/Fu/PCE SK7	+	13	-0,006
Py/Fu SK121	-	27	-0,018
Py/Fu SK121-i-7	-	28	-0,011
Py/Fu/PCE SK121-i-7	+	> 84	-0,002

Py: Pyruvat; Fu: Fumarat; PCE: Tetrachlorethen; PceA: PCE-Dehalogenase exprimiert (+) oder nicht (-); SKX: Subkultivierung über X Tage; i: PceA einer PceA⁻-Kultur (SK121) wurde durch Kultivierung auf Py/PCE wieder induziert, anschließend erfolgte eine Subkultivierung über 7 Tage auf Pyruvat/Fumarat mit oder ohne PCE.

3.4.2. Unterschiede im Gefrierbruch

In früheren Versuchen wurde ein ungewöhnliches Bruchverhalten für *S. multivorans* Zellen beobachtet, die auf Pyruvat/Fumarat kultiviert worden sind. Die Zellen zeigten ein Brechungsverhältnis äußere Membran:Zytoplasmamembran von 9:1. Dieses Bruchverhalten kehrte sich in das Gegenteil um, wenn im Kulturmedium PCE vorhanden war. Hier brachen die Zellen zu fast 100% in der Zytoplasmamembran. Aufgrund des ähnlichen Wachstumsverhaltens der Kultur nach 121 Tagen auf Pyruvat/Fumarat (SK121) und der Kultur mit PCE (Abb. 16, Tab. 5) wurden nun bei diesen Zellen ein gleiches Bruchverhalten erwartet. Deshalb wurden von diesen Kulturen elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Gefrierbruch erstellt.

Wie erwartet, zeigte sich bei den PceA-negativen Zellen (SK121) ein völlig neues Bruchverhalten (Abb. 20, B). Diese Zellen brachen kaum noch in der äußeren

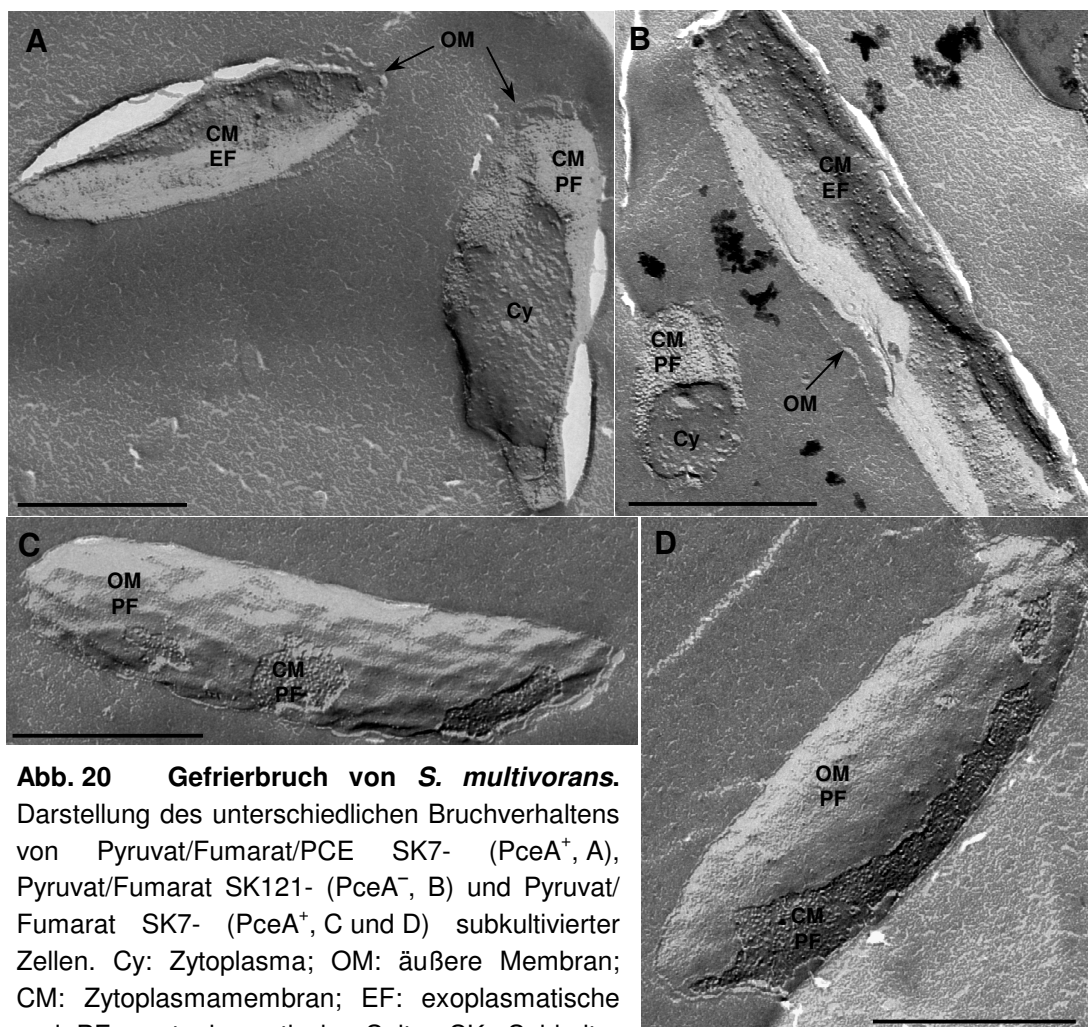


Abb. 20 Gefrierbruch von *S. multivorans*. Darstellung des unterschiedlichen Bruchverhaltens von Pyruvat/Fumarat/PCE SK7- (PceA^+ , A), Pyruvat/Fumarat SK121- (PceA^- , B) und Pyruvat/Fumarat SK7- (PceA^+ , C und D) subkultivierter Zellen. Cy: Zytoplasma; OM: äußere Membran; CM: Zytoplasmamembran; EF: exoplasmatische und PF: protoplasmatische Seite; SK: Subkultur. Der Maßstab entspricht 500 nm.

Membran sondern zum größten Teil in der Zytoplasmamembran. Die Kultur auf Pyruvat/Fumarat/PCE SK7 (PceA⁺) zeigte ebenfalls dieses Bruchverhalten (Abb. 20, A). Einzig die Kultur nach sieben Passagen auf Pyruvat/Fumarat SK7 (PceA⁺) zeigte wieder das Bruchverhalten in der äußeren Membran (Abb. 20, C und D). Hier erfolgte der Gefrierbruch fast über die ganzen Zellen hinweg in der äußeren Membran, wohingegen sie in den anderen beiden Fällen nur im Querschnitt zu sehen war (Abb. 20, A und B). Die Ursache für den Bruch in der äußeren Membran Dehalogenase-positiver Zellen in Abwesenheit von PCE könnte in der zytoplasmatischen Lokalisation der PCE-Dehalogenase liegen.

4. Diskussion

4.1. Lokalisation der PCE-Dehalogenase von *Sulfurospirillum multivorans*

In früheren Versuchen wurde die Lokalisation der PCE-Dehalogenase (PceA) in *S. multivorans* an Zellen durchgeführt, die auf Pyruvat/Fumarat kultiviert worden waren. In diesen Zellen wurde PceA auch in Abwesenheit von PCE exprimiert. Vergleichende Messungen der Enzymaktivitäten an permeabilisierten und intakten Zellen führte zu dem Schluss, dass die Dehalogenase ein zytoplasmatisch lokalisiertes Enzym sei. Allerdings wurde für diese Versuche CTAB (0,01%) als permeabilisierendes Agens eingesetzt. CTAB hemmte in dieser Konzentration die PCE-Dehalogenase zu 60-80% (Miller et al. 1996). Des weiteren lag die verwendete Konzentration von CTAB über der kritischen Micellkonzentration, die von der Ionenstärke des Puffers abhängig ist (Häfner 2002). Durch die Micellbildung können die Versuche gestört werden und Nebeneffekte auftreten, die eine Auswertung des Experiments erschweren (Radu et al. 2005).

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Protamin oder Lysozym als membran-attackierende Agenzien eingesetzt. Protamin besteht aus 32 Aminosäuren. Seine stark kationischen Eigenschaften begründen sich in dem hohen Argininanteil (> 60%). Die Art der Permeabilisierung der Zellhülle ist noch nicht geklärt. Jedoch wird angenommen, dass Protamin Poren in der Membran bilden oder mit negativ geladenen Membranbestandteilen interagieren kann und so eine Zerstörung der Zelle herbeiführt (Johansen et al. 1997). Lysozym schwächt die bakterielle Zellwand durch Hydrolyse der β -1,4-glykosidischen Bindung zwischen N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Durch Überführung der so behandelten Zellen in ein hypotonisches Umfeld (Messpuffer ohne Saccharose) wurde ein Platzen der Zellen aufgrund des hohen osmotischen Zellinnendrucks herbeigeführt.

Anhand der Enzymmessungen vor und nach Permeabilisierung mit Protamin oder Lysozym konnte eine eindeutige Aussage über die Lokalisation der PCE-Dehalogenase nicht getroffen werden. Die Ergebnisse widersprachen den Westernblotanalysen sowie den Resultaten der elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Warum die widersprüchlichen Ergebnisse nur für die PCE-Dehalogenase erhalten wurden, konnte nicht geklärt werden. Die Verteilung der Aktivitäten der Kon-

trollenzyme entsprach den Literaturangaben für *Wolinella succinogenes* (Kröger et al. 1992), phylogenetisch eng mit *S. multivorans* verwandt.

Diese Tatsache fordert eine kritischere Betrachtung der Ergebnisse von Lokalisationsstudien anderer reduktiver Dehalogenasen. So wurde die PCE-Dehalogenase von *Dehalobacter restrictus* als zytoplasmatisch membranassoziiertes Enzym beschrieben, nachdem für die Permeabilisierung der Zellen Triton X-100 eingesetzt worden war (Schumacher und Holliger 1996). Ähnliche Ergebnisse wurden für *Desulfotobacterium hafniense* Stamm PCE-S (Miller et al. 1997) unter Verwendung von CTAB erhalten. In *Dehalococcoides ethenogenes* Stamm 195 (Nijenhuis und Zinder 2005) waren die PCE- und TCE-Dehalogenasen für Methylviologen im Enzymtest an ganzen Zellen zugänglich, weshalb auf eine periplasmatische Lokalisation der Enzyme geschlossen wurde. Die Autoren konnten jedoch nicht ausschließen, dass die Elektronen vom Methylviologen auf eine der PCE-Dehalogenase vorgeschaltete Komponente der Elektronentransportkette übertragen wurde, die dann natürlich auch zytoplasmatisch membranassoziiert vorliegen könnte. Für die Permeabilisierung von *Desulfotobacterium dehalogenans* (van de Pas et al. 2001) wurde eine zehnfach höhere Konzentration von CTAB eingesetzt als für *S. multivorans* (Miller et al. 1996) bzw. *D. hafniense* Stamm PCE-S (Miller et al. 1997), so dass es nicht verwunderlich ist, dass keine Aktivität der ClOHPA-Dehalogenase gemessen werden konnte. Für *Desulfomonile tiedjei* wurde eine zytoplasmatische Lokalisation der 3-Chlorbenzoat (3-CB)-Dehalogenase vorgeschlagen, weil die Zugabe von reduziertem Methylviologen zu Zellsuspensionen die 3-CB-Reduktion nicht stimulierte (Louie und Mohn 1999). Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen der elektronenliefernde Schritt limitierend war.

Alle bisherigen Lokalisationsstudien von reduktiven Dehalogenasen basieren auf den Enzymmessungen an ganzen bzw. permeabilisierten Zellen mit Methylviologen als alternativen Elektronendonator. Der Nachweis einer periplasmatischen Dehalogenase könnte durch die Maskierung der elektronenakzeptierenden Seite des Enzyms (Orientierung zur Membran) verhindert werden. Deshalb können diese Studien allenfalls Indizien liefern.

Unter Verwendung immunologischer Methoden konnte die PCE-Dehalogenase lokalisiert werden. Erstmals wurde eine direkte Beeinflussung der Lokalisation der PCE-Dehalogenase durch den Elektronenakzeptor nachgewiesen (Abb. 2 und 4).

PCE und das alternative Substrat TCE scheinen den Transport an die Membran und in Folge dessen auch die Prozessierung der Dehalogenase zu initiieren (Abb. 2, 3 und 4). In Abwesenheit der chlorierten Substrate liegt der größte Teil des Enzyms in seiner unprozessierten Form vor. Die Subkultivierung des Organismus auf Pyruvat/Fumarat mit dem Endprodukt der Dechlorierung (*cis*-DCE) führte innerhalb von sieben Tagen (Subkulturen) zum Verlust von PceA (Abb. 4). Dieses Ergebnis deutet auf eine Katabolitrepression hin. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich die konstant hohe Konzentration von *cis*-DCE (0,5 M in Hexadekan; 1 ml pro 50 ml Medium) in der Kultur negativ auf die Zellen ausgewirkt hat. Die Kulturen mit *cis*-DCE sind im Vergleich zu den anderen Kulturen viel schlechter gewachsen.

In vitro-Untersuchungen an einem Tat-abhängigen Substrat (HiPIP) von *Allochromatium vinosum* zeigten, dass das Tat-Leaderpeptid nicht an der Bildung von Sekundärstrukturen beteiligt ist. Das reife und das unprozessierte Protein (exklusive Tat-Leader) haben die selbe Sekundärstruktur (Kipping et al. 2003). Entsprechend dieser Ergebnisse liegt die unprozessierte PCE-Dehalogenase in korrekt gefalteter Form im Zytoplasma vor, zumal sie auch in dieser Form voll aktiv ist. Für die Erkennung des Tat-Substrats fordern die Autoren allerdings die Bildung einer erkennbaren Struktur für die Interaktion mit dem Translokon oder mit Chaperonen.

Um die Lokalisation der PCE-Dehalogenase eindeutig nachzuweisen, wurde das Enzym mit spezifischen Antikörpern in Zellen nach Gefrierbruch detektiert. Diese wurden mit sekundären goldmarkierten Antikörpern nachgewiesen. Mit dieser Methode konnte die durch die Westernblotanalysen beobachtete Prozessierung von PceA bei Anwesenheit von PCE/TCE und der vermutete Export ins Periplasma eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 4). PCE und TCE haben somit einen direkten oder indirekten Effekt auf den Transport des Enzyms über die Membran ins Periplasma. Möglicherweise induziert PCE eine Konformationsänderung des Enzyms und erlaubt so den Transport durch Tat-spezifische Chaperone zur Membran. Eine direkte Beeinflussung des Tat-Apparates ist nicht auszuschließen. Allerdings wird die charakterisierte Formiatdehydrogenase des Organismus (Schmitz und Diekert 2003, 2004), die ebenfalls ein Tat-Signalpeptid besitzt, durch PCE in ihrer Lokalisation nicht beeinflusst (Tab. 2). Wie PCE den Transport der PCE-Dehalogenase an die Membran und den danach erst möglichen Export ins Periplasma induziert, muss Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein. Erschwert werden diese Untersuchungen allerdings

durch ein fehlendes genetisches System für *S. multivorans*. Alle Versuche, dieses zu etablieren, schlugen bislang fehl.

Neben *D. hafniense* Stamm PCE-S (Miller et al. 1998) ist *S. multivorans* der einzige PCE-dechlorierende Organismus, der die reduktive Dehalogenase auch in Abwesenheit der chlorierten Substrate exprimiert (Neumann et al. 1996, 1998). *D. restrictus* ist obligat auf PCE als einzigen Elektronenakzeptor angewiesen und bildet mit seiner konstitutiv exprimierten Dehalogenase in dieser Enzymgruppe eine Ausnahme (Holliger et al. 1993). Alle anderen beschriebenen reduktiven Dehalogenasen werden in den Bakterien erst durch Anwesenheit des Substrats induziert. Die Regulation der ClOHPA-Dehalogenase von *D. dehalogenans* ist am besten untersucht und findet auf der Ebene der Transkription statt (Smidt et al. 2000). Für die Lokalisation der PCE-Dehalogenase von *S. multivorans* muss eine Regulation auf posttranslationaler Ebene postuliert werden. Der Organismus exprimiert das Enzym auch in Abwesenheit seines Substrats. Erst nach Kontakt mit PCE wird der Transport an die Membran sowie der Export ins Periplasma initiiert. Warum wird das Enzym in Abwesenheit von PCE überhaupt exprimiert? Eventuell hat das Vorhandensein von PceA in aktiver Form einen Vorteil für den Organismus. Aufgrund der funktionstüchtigen PCE-Dehalogenase in Abwesenheit von PCE kann er schneller auf eine Änderung der Substratverfügbarkeit reagieren als andere Organismen, deren Transkription des Dehalogenase-Gens erst nach Kontakt mit dem Substrat induziert wird. Dadurch gewinnt der Organismus möglicherweise einen zeitlichen Vorsprung zur Besetzung der Nische bzw. Nutzung des Substrats und kann sich gegenüber anderen PCE-Dechlorierern behaupten. Außerdem lässt eine zytoplasmatische PCE-Dehalogenase dem Organismus die Möglichkeit offen, PCE eventuell als Elektronenakzeptor ohne Kopplung an die chemiosmotische Energiekonservierung zu verwenden.

Für die Funktion der Atmungskette in Zellen, die mit PCE als terminalem Elektronenakzeptor wachsen, ist die Lokalisation von PceA von großer Wichtigkeit. Für die Energiekonservierung via Dehalorespiration muss das Enzym membranassoziiert sein. Deshalb wurde die prozentuale Verteilung des membranassoziierten Enzyms (sowohl peri- als auch zytoplasmatisch) in elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestimmt. In Zellen, die mit PCE kultiviert wurden, konnten jeweils ca. 95% (Formiat/PCE und Pyruvat/PCE) der PCE-Dehalogenase auf der periplasmatischen Seite der Zytoplasmamembran nachgewiesen werden. In Pyruvat/Fumarat-gewachsenen

Zellen wurden nur 32% auf der periplasmatischen Seite detektiert (Tab. 3). Diese prozentuale Verteilung ergibt sich allerdings aus der Betrachtung des membranassoziierten Enzyms. Der Hauptteil der PCE-Dehalogenase liegt in diesen Zellen jedoch zytoplasmatisch vor (Abb. 4 und 5), so dass der tatsächliche Prozentsatz der periplasmatisch lokalisierten PCE-Dehalogenase viel niedriger wäre, wenn diese in der Berechnung Berücksichtigung fände. Der lösliche Anteil wurde nicht abgeschätzt, da von einer Flächenausählung nur bedingt auf das Volumen hochgerechnet werden kann. Hierfür müsste eine Gleichverteilung der PCE-Dehalogenase im Zytoplasma angenommen werden, was jedoch anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen allenfalls vermutet werden kann.

Das lösliche Enzym ist für das Modell der reduktiven Dechlorierung irrelevant, da es an der Energiekonservierung über die Bildung eines chemiosmotischen Gradienten nicht beteiligt sein kann. Jedoch ist es nicht ausgeschlossen, dass die PCE-Dehalogenase in löslicher Form eine essentielle Rolle als Elektronenakzeptor in Zellen spielt, die auf PCE und einem Elektronendonator wachsen, dessen Oxidation an eine Substratstufenphosphorylierung gekoppelt ist (z. B. Pyruvat). Die Anwesenheit einer reduktiven Dehalogenase bedeutet somit nicht notwendigerweise Energiegewinnung durch Dehalorespiration.

Das früher postulierte Modell der reduktiven PCE-Dechlorierung in *S. multivorans* (Miller et al. 1997; Wohlfarth und Diekert 1997; Holliger et al. 1998a) muss somit revidiert werden. Dort wurde die Erzeugung eines elektrochemischen Protonengradienten durch Wasserstoffoxidation zu zwei Protonen bzw. durch Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid und einem Proton im Periplasma und Protonenverbrauch im Zytoplasma durch die reduktive Dechlorierung in der Zelle postuliert. Mit einer periplasmatischen Lokalisation der PCE-Dehalogenase lässt sich das alte Modell (Abb. 1) nicht vereinbaren.

Nun muss angenommen werden, dass der Protonengradient durch einen Menachinonloop oder einer Protonenpumpe erzeugt wird (Abb. 21). Da die PCE-Dehalogenase kein fest an der Membran gebundenes Enzym ist, ist es unwahrscheinlich, dass es als Protonenpumpe fungiert (Miller et al. 1997). Im *pce*-Operon befindet sich ein zweites Gen, das für PceB kodiert. Dieses "putative" Protein ist in der Literatur als möglicher Membrananker beschrieben (Neumann et al. 1998). PceB besitzt kein Cystein bzw. Histidin in seiner Sequenz. Diese Aminosäuren koordinieren Eisen-Schwefel-Zentren sowie Cytochrome. Da beide Aminosäuren fehlen, ist

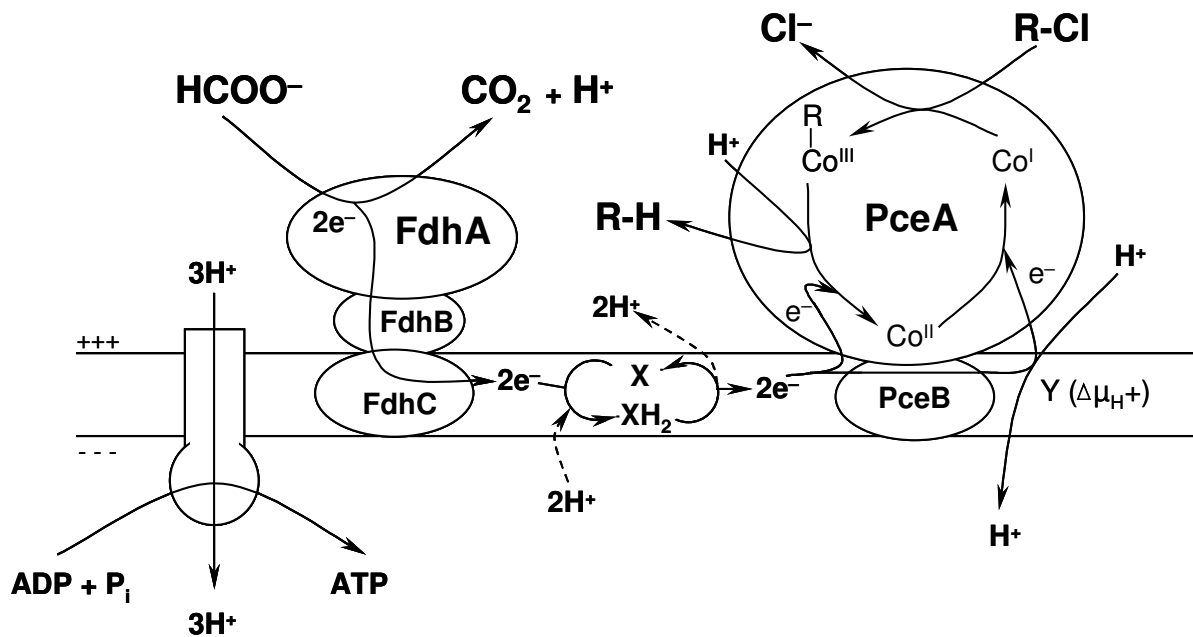


Abb. 21 Modell der Atmungskette von *S. multivorans* für die reduktive Dechlorierung von PCE mit Formiat als Elektronendonator. PceA: reduktive Dehalogenase (aktive Untereinheit); PceB: postulierter Membrananker; FdhA-C, Formiatdehydrogenase Untereinheiten; X: Elektronenmediator, vermutlich ein Chinon; Y: Komponente, die am revertierten Elektronentransport beteiligt ist; $\text{Co}^{\text{I-III}}$: Cobalt in den verschiedenen Oxidationsstufen.

eine Beteiligung an Elektronenübertragungsprozessen über die Membran eher unwahrscheinlich (Fisher und Rich 2000; Jormakka et al. 2002). Deshalb wird ein Menachinonloop favorisiert (Richardson und Sawers 2002). In diesem Fall repräsentiert „X“ in Abbildung 21 Menachinon. Ein thermodynamisches Problem existiert dennoch in der Reduktion von Cob(II)alamin zu Cob(I)alamin im katalytischen Reaktionszyklus. Das Standardredoxpotential des Paares Cob(II)/Cob(I)alamin bei pH 7,0 beträgt <-350 mV. Unter der Annahme, dass Menachinon ($E^\circ = -74$ mV) der Elektronendonator für die Reduktion von Cob(II)alamin ist, muss zusätzliche Energie aufgebracht werden, damit diese Reaktion ablaufen kann. Aufgrund früherer Untersuchungen wurde ein revertierter Elektronentransport vorgeschlagen, um diese thermodynamisch ungünstige Reduktion zu ermöglichen (Miller et al. 1997). An der dadurch notwendigen Protonentranslokation könnte eine weitere Komponente (Y in Abb. 21) beteiligt sein.

4.2. Nachweis der Expression von PceB

Über die Funktion des zweiten Gens (*pceB*) im Operon reduktiver Dehalogenasen bzw. seines Produkts existieren bis heute nur Spekulationen (Neumann et al. 1998; Suyama et al. 2002). Eine Expression des Gens B konnte experimentell noch nicht bestätigt werden. Lediglich die Kotranskription von *pceAB* in *Sulfurospirillum multivorans* (Neumann et al. 1998), *cprBA* in *Desulfitobacterium dehalogenans* (Smidt et al. 2000), *prdAB* in *Desulfitobacterium* sp. Stamm KBC1 (Tsukagoshi et al. 2006) sowie von *vcrABC* in *Dehalococcoides* sp. Stamm VS (Müller et al. 2004) sind beschrieben.

Aufgrund seiner Aminosäurezusammensetzung wurde eine mögliche Funktion als Membrananker für die Dehalogenase postuliert (Neumann et al. 1998). PceB konnte aus *S. multivorans* nicht isoliert werden. Wiederholte Versuche der Isolierung aus der Membranfraktion von Zellen, die auf Pyruvat/Fumarat oder Pyruvat/PCE kultiviert worden waren, schlugen fehl. Der Versuch, PceB im Westernblot mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen, endete reproduzierbar mit falsch-positiven Ergebnissen. Das Protein, welches durch die Antikörper detektiert wurde, konnte durch N-terminale Sequenzierung als ribosomales Protein identifiziert werden (persönliche Mitteilung Dr. B. Schlott, Fritz-Lipmann-Institut Jena). Aufgrund des fehlenden genetischen Systems ist eine Funktionsanalyse für PceB über Deletionsexperimente bisher nicht möglich.

Die Expression der PCE-Dehalogenase in *E. coli* in löslicher Form war bis jetzt noch nicht erfolgreich. Auch die Verwendung verschiedener Fusionspartner (Malto-sebindeprotein, Glutathion-S-Transferase, Strep-Tag, TorA-Leaderpeptid) zur Expression der PCE-Dehalogenase in *E. coli* brachten keinen bzw. nur geringen Erfolg bezüglich der Löslichkeit des Proteins (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein Grund könnte das Fehlen des Kofaktors sein, der bisher nur aus *S. multivorans* isoliert wurde (Kräutler et al. 2003). Aufgrund des fehlenden Kofaktors könnte das heterolog exprimierte Protein in *E. coli* fehlgefaltet vorliegen und somit die Bildung von Einschlusskörpern begünstigen.

Die heterologe Überexpression von Membranproteinen stellt ein generelles Problem dar. Aufgrund ihrer Hydrophobizität lagern sich diese Proteine in die Membran ein und führen dort relativ schnell zum "Verstopfen" dieser, so dass lebensnotwendige Prozesse gestört oder unterbunden werden. Dies endet für den Wirt schnell tödlich. Frühere Expressionsversuche von *pceB* in *E. coli* führten nach Zugabe des

Induktors zu einem raschen Absterben der Zellen. Eine Expression dieses Proteins war bis jetzt nur in Form von Fusionsproteinen erfolgreich. Die exprimierten Proteine (MBP-PceB, GST-PceB sowie PceB-LacZ α) lagen jedoch alle in unlöslicher Form vor.

Die Gene *pceAB* zeichnen sich durch eine Überlappung von vier Basenpaaren aus. In der Literatur ist dieses Phänomen als "Overlapping Genes" (Gesteland und Atkins 1996; Normark et al. 1983) bekannt. Beschriebene Beispiele zeigen eine translationale Kopplung der überlappenden Gene. Dadurch kann eine Expression beider kodierten Proteine in (sub)stöchiometrischen Verhältnissen zueinander ohne Beteiligung weiterer Regulatoren sichergestellt werden (Blinkova et al. 1997; Liljeström et al. 1988). Die Genprodukte überlappender Genpaare sind oft funktionell miteinander gekoppelt (Oppenheim und Yanofsky 1980; Yakhnin et al. 2001).

Die gekoppelte Translation von *pceAB* sollte deshalb in *E. coli* untersucht werden. Dazu wurden Plasmide konstruiert, bei dem das Gen der Dehalogenase (*pceA*) und des Membranankers (*pceB*) mit dem Gen der β -Galactosidase fusioniert wurden. Die Quantifizierung der Expression sollte über die Messung der Aktivität des Fusionspartners erfolgen. Eine Expression von PceB-LacZ α in *E. coli* konnte nur dann erfolgen, wenn die Gene des Operons auch in *E. coli* kotranskribiert wurden. Des weiteren muss die wirtsfremde degenerierte Shine-Dalgarno-Sequenz vor dem Startcodon von *pceB* (innerhalb von *pceA*) erkannt und durch ein -1-Frame-Shift-Ereignis des Ribosoms die Translation von PceB initiiert werden. Nach der Ermittlung des Verhältnisses der beiden Proteine zueinander wäre eine Aussage über die Funktion von PceB möglich. Ein stöchiometrisches Verhältniss von PceA:PceB (1:1) wür-

A ¹	TGCAGGGAGCAACCAAAGC AAAAAA GAGTGAACCGGCAGCCGCTACCCGCGCGCGGCCGGTGA
B ²	CGCAGGGAGTAACCAAAC AAAAAA GAGTGAACCGGCAGCCGCTACCCGCGCGCGGCCGGTGA
C ¹	AGTCGGGACGACCACAAC AAAAAA GAA TGA GCCGGCGGCCAGGAAAAGCGCGGCCGGCAA
D ¹	AAAACAAAGGCGCGGATGG AAAAAA GTCTGACGCGACATCTGCTACTCCAGCATCGGCGCTAG
E ³	CTTTAGAAAGGATAGGGTT AAAAAA TCATGA AATTATTAAATATTTTAAATTATAAAGCGCTT

Abb. 22 Vergleich zwischen verschiedenen *dnaX*-Genen mit dem Genüberlappungsbereich von *pceAB* von *S. multivorans*. grau unterlegt: mögliche Ribosomenbindestelle; PolyA-Sequenz: -1-frameshift site; schwarz unterlegt: internes Stoppcodon bzw. überlappendes Stopp- und Startcodon; unterstrichen: Basen, die in der Bildung von Stamm-Schleifen-Strukturen involviert sind. A-D *dnaX*-Gen von A: *Escherichia coli*, B: *Salmonella typhimurium*, C: *Yersinia pestis*, D: *Vibrio cholerae* und E: *pceAB* von *S. multivorans*. ¹Baranov et al. 2002; ²Blinkova et al. 1997; ³Neumann et al. 1998.

von PceB möglich. Ein stöchiometrisches Verhältniss von PceA:PceB (1:1) würde die Membranankerhypothese unterstützen, wohingegen ein Verhältnis größer als eins diese Hypothese widerlegen würde.

Nach Induktion der Expression in *E. coli* lagen die Proteine in unlöslicher und inaktiver Form vor. Auch die Zugabe von Harnstoff konnte die Aktivität des Fusionspartners nicht herstellen. Die Auswertung der Versuche konnte somit nicht durch die Messung der β -Galactosidase erfolgen. Dennoch war eine Abschätzung des Verhältnisses der exprimierten Proteine in den Klonen mit *pceAB-lacZ α* über SDS-Gele möglich. Wie in den Abbildungen 6 und 7 zu sehen ist, wurden die Gene des Operons *pceAB* in *E. coli* kotranslational in einem Verhältnis von ca. 1:1 exprimiert.

Interessanterweise enthält die Sequenz von *pceAB* ein Motiv (A_6 , Abb. 22), welches in ähnlicher Weise im *dnaX*-Gen von *E. coli* wiederzufinden ist (Baranov et al. 2002). Dieses Gen kodiert für die zwei Untereinheiten (τ und γ) der DNS-Polymerase III, wobei der γ -Untereinheit ca. $\frac{1}{3}$ des C-Terminus der τ -Untereinheit fehlt. Durch ein -1-Frameshift-Ereignis erkennt das Ribosom ein internes Stoppcodon, welches zum Abbruch der Translation und somit zur Entstehung der γ -Untereinheit führt. Der Abbruch der Translation erfolgt bei jeder zweiten Translation, so dass die beiden Untereinheiten im Verhältnis 1:1 vorliegen (Weiss 1991). Für den -1-Frameshift sind neben dem erwähnten Motiv eine Ribosomenbindestelle (upstream von A_6) sowie eine downstream gelegene Stamm-Schleifen-Struktur erforderlich. Diese ist, wenn vorhanden, im *pceAB*-Operon nur rudimentär ausgebildet (wenig Cytosin und Guanin in der 5'-Sequenz von *pceB* vorhanden). Die Sequenzen in den *dnaX*-Genen sind sehr GC-reich und bilden aufgrund dessen viel stabilere Stamm-Schleifen-Strukturen aus (Abb. 22). Aufgrund dieser auffälligen Sequenz-übereinstimmung ist es nicht überraschend, dass in *E. coli* die Gene *pceAB* kotranslatiert werden. Die Stabilität der Stamm-Schleifen-Struktur in der RNS von *pceAB* reichte aus, um das -1-Frameshift-Ereignis in *E. coli* zu ermöglichen.

Die Situation in *S. multivorans* konnte durch diesen Versuch jedoch nicht abschließend geklärt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die Kotranslation von PceA und PceB in *E. coli* im Verhältnis 1:1 nur auf die hohe Homologie zum *dnaX*-Gen (Frameshift-Sequenz) von *E. coli* zurückzuführen ist. Die Funktionsanalyse von PceB wird sich nicht ohne ein genetisches System für *S. multivorans* lösen lassen. Somit bleibt die Funktion von PceB weiterhin spekulativ.

4.3. Expression der PCE-Dehalogenase

Die Expression von PceA auch in Abwesenheit des Substrats PCE in *S. multivorans* führte zu der Beschreibung als konstitutiv exprimiertes Enzym (Neumann et al. 1996). Diese Aussage konnte mit der Subkultivierung auf Pyruvat/Fumarat über einen langen Zeitraum widerlegt werden. Obwohl die Aktivität erst nach 15 Subkultivierungen abnimmt und ab Passage 35 vollständig verschwunden ist (Abb. 8 und 9), erfüllt das Enzym somit nicht mehr die Bedingungen für die Definition eines konstitutiv exprimierten Proteins. Dieses Phänomen der langsamen Regulation ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Warum es bei Bakterien generationsübergreifende Regulationsmechanismen geben sollte, ist sehr schwer zu verstehen. Möglicherweise ist der Verlust der Aktivität der PCE-Dehalogenase eine Folge der Adaption an die konstante Umwelt (Pyruvat/Fumarat-Medium), welche sich auch in der Verdopplung der Fumaratreduktaseaktivität widerspiegelt (Abb. 10). Eventuell unterscheiden sich die Komponenten der Elektronentransportkette der Fumarat- und PCE-Atmung stark und wirken sich jeweils negativ auf den anderen Atmungstyp aus.

Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation nicht nur auf translationaler Ebene erfolgt, sondern dass ebenfalls die Transkription von *pceA* abnimmt, aber noch nicht vollständig zum Erliegen kommt. Der Verlust der Aktivität geht jedoch nicht mit dem Verlust des Gens einher. Somit muss ein Regulationsmechanismus postuliert werden, der erst nach langer Abwesenheit von PCE zum Tragen kommt und zur Einstellung der Translation der PCE-Dehalogenase sowie zur Abnahme der Transkriptmenge von *pceA* führt. Es ist schwer vorstellbar, warum die Organismen immer noch ein Gen transkribieren, dessen Produkt für den Abbau eines Substrats benötigt wird, das seit 120 Generationen in der Umwelt der Bakterien nicht mehr vorhanden war.

S. multivorans bildet als Hauptcorrinoid Norpseudovitamin-B₁₂ (Neumann et al. 2002; Siebert 2002). Neben der PCE-Dehalogenase ist bis jetzt kein weiteres Enzym dieses Organismus bekannt, das diesen Kofaktor besitzt. Außerdem wurde Norpseudovitamin-B₁₂ bisher nur in *S. multivorans* gefunden. Ein Vergleich der Corrinoidextrakte aus den PceA-positiven und -negativen Zellen zeigte, dass der Norpseudovitamin-B₁₂-Gehalt der PceA-negativen Zellen um den Faktor 60 niedriger war als im Organismus mit aktiver PCE-Dehalogenase. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Enzym den Hauptteil des gebildeten Corrinoids als Kofaktor nutzt.

Ebenso liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Expression der PCE-Dehalogenase und die Synthese des Kofaktors miteinander gekoppelt sind.

In *Salmonella typhimurium* (Roth et al. 1996) gibt es ein ähnliches System, bei dem die Transkription der B₁₂-Biosynthese-Gene und des B₁₂-abhängigen Enzyms Propandioldehydratase koreguliert werden. Die Gene liegen invers zueinander in direkter Nachbarschaft und sind von einem Gen getrennt, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert seine eigene Transkription auf dem Basallevel in Abwesenheit von Propandiol. Liegt Propandiol im Medium vor, wird nicht nur die eigene Transkription/Expression erhöht, sondern auch die Transkription der B₁₂-Synthese-Gene sowie des Gens der Propandioldehydratase. Somit ist die Menge an Vitamin-B₁₂ in den Zellen direkt abhängig vom Kultivierungssubstrat und dementsprechend von der Konzentration der Propandioldehydratase.

Im nicht-dechlorierenden *S. multivorans* Stamm N konnte nachgewiesen werden, dass der Organismus nicht in der Lage ist, den spezifischen Kofaktor zu synthetisieren (Siebert et al. 2002). Obwohl die Transkription von *pceA* nachgewiesen werden konnte, war der Nachweis der PCE-Dehalogenase mit den spezifischen Antikörpern nicht erfolgreich. Die Autoren schlossen, dass der Kofaktor in der Regulation der Transkription und/oder Translation von *pceA* eine Rolle spielen könnte. Es ergibt sich nun die Frage, ob durch die Subkultivierung auf Pyruvat/Fumarat die Einstellung der Expression von *pceA* die Folge der Einstellung der Synthese von Norpseudovitamin-B₁₂ oder umgekehrt die Abnahme der Kofaktorsynthese die Folge der Unterbrechung der Expression von PceA ist.

In den Zellen von *S. multivorans*, welche die PCE-Dehalogenase nicht mehr exprimieren, konnte das erste Mal die Induktion des Enzyms untersucht werden. Dafür wurden verschiedene Substratkombinationen gewählt. Wie in den Abbildungen 14 und 15 zu sehen ist, war die Induktion des Enzyms mit PCE erfolgreich. Jedoch war PceA erst nach mehr als 50 Stunden im Westernblot als auch indirekt durch die Entstehung von *cis*-DCE nachweisbar. Im Gegensatz dazu ist die *ortho*-Chlorphenol-Dehalogenase von *D. dehalogenans* schon 30 Minuten nach Zugabe des Substrats messbar (Smidt und de Vos 2004). Das Operon von *S. multivorans* enthält im Gegensatz zum Operon von *D. dehalogenans* kein Gen für einen spezifischen Transkriptionsfaktor. Eine spezifische Transkriptionskontrolle ist daher unwahrscheinlich. Da die PCE-Dehalogenase über einen langen Zeitraum "konstitutiv"

exprimiert wird, könnte das "Induktionssystem" in diesem Organismus degeneriert sein.

4.4. Vergleich von PceA-positiven und -negativen Kulturen

Die PceA⁺-und PceA⁻-Kulturen von *S. multivorans* auf Pyruvat/Fumarat unterscheiden sich in der Stabilität der Zellen. Die PceA⁻-Kultur zeigte das gleiche Wachstums- und Gefrierbruchverhalten wie die Zellen einer Pyruvat/Fumarat/PCE-Kultur mit exprimierter Dehalogenase. Im Gegensatz dazu bestätigte sich für die PceA⁺-Zellen in Abwesenheit von PCE die schon seit langer Zeit beobachtete hohe Fragilität auf Pyruvat/Fumarat-Medium durch eine sehr schnelle Absterbephase.

Schnelle Absterbephasen sind von *E. coli* AK7 beschrieben (Scaravaglio et al. 1993). Dieser Stamm ist auxotroph für die Fettsäuresynthese und reagiert auf Hungerphasen mit einer erhöhten Sensibilität auf hypoosmotische Bedingungen. Diese Änderungen treten automatisch während des Wachstums und somit mit dem Verbrauch der Substrate ein. Aufgrund der Auxotrophie der Zellen für Fettsäuren sind sie nicht mehr in der Lage, auf wechselnde Umweltbedingungen mit Änderungen der Fettsäurezusammensetzung in der Membran zu reagieren und somit die Fluidität der Membran zu variieren. Diese Phänomene wurden bereits während Hungerstadien von *Aeromonas salmonicida* beobachtet und werden für das Überleben der Zellen diskutiert (Morgan et al. 1991).

Die Fluidität der äußeren Membran von *E. coli* wird des weiteren direkt oder indirekt von der Länge der Lipopolysaccharid (LPS)-Seitenketten beeinflusst. Je länger die LPS-Ketten sind, desto weniger beweglich ist der Lipidteil der äußeren Membran (Rottem und Leive 1977). Ähnliche Ergebnisse wurden für *Proteus mirabilis* erhalten. Dieser Organismus zeigt im Gefrierbruch ein unterschiedliches Bruchverhalten (Armitage 1982). Einerseits verhalten sich nicht-schwärmende Zellen im Gefrierbruch wie "normale" Gram-negative Bakterien. Der Bruch erfolgt in der Zytoplasmamembran, wohingegen die äußere Membran nur in Querbrüchen zu sehen ist (Abb. 23). Die vernetzte Struktur sowie die Asymmetrie der äußeren Membran mit dem hohen LPS-Gehalt und den geringen Gehalt an Phospholipiden (Costerton et al. 1974; Mühlrad 1975) sind dafür verantwortlich, dass im Gefrierbruch die äußere Membran sehr schwer zu spalten ist (Hasin et al. 1975; Irvin et al. 1979). Die Schwärmerzellen von *P. mirabilis* brechen dagegen sowohl in der Zytoplasma-

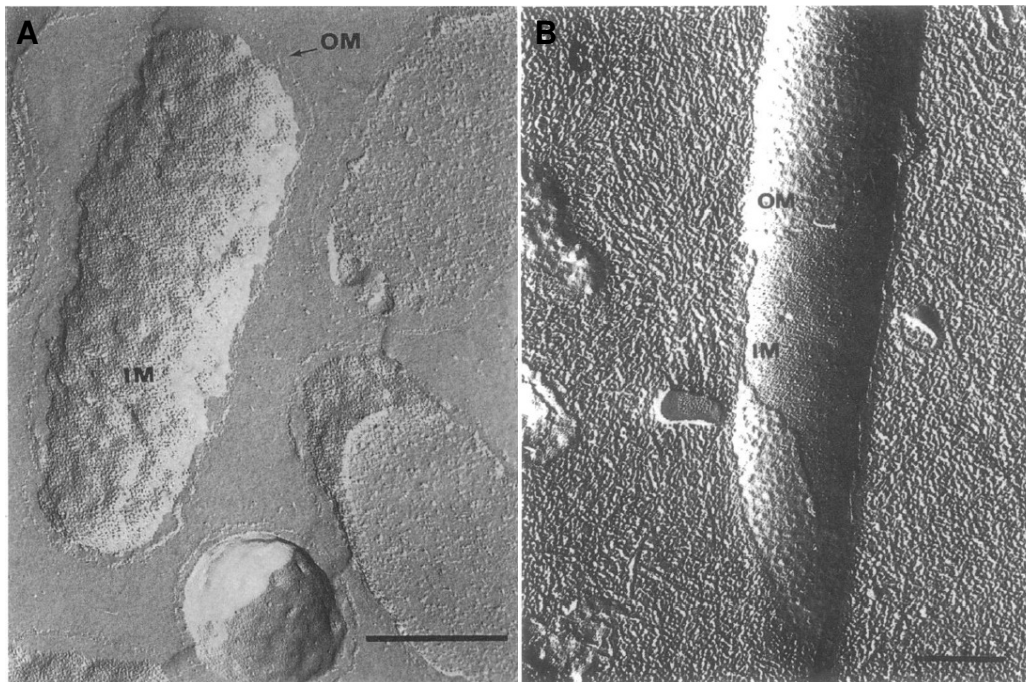


Abb. 23 Gefrierbruch von *Proteus mirabilis* (Armitage 1982). Dargestellt ist das unterschiedliche Bruchverhalten von nichtschwärmenden (A) und schwärmenden Zellen (B). In A ist die äußere Membran nur im Querschnitt zu sehen, wohingegen die äußere Membran in B Bruchflächen zeigt. OM: äußere Membran; IM: innere Membran (= Zytoplasmamembran). Der Maßstab entspricht 500 nm.

membran als auch in der äußeren Membran (Abb. 23). Armitage (1982) belegt dieses Bruchverhalten mit Elektronenspinresonanz-Spektroskopie der äußeren Membranen beider Zelltypen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Nichtschwärmer eine stabilere äußere Membran haben als die Schwärmerzellen.

Ähnliche Beobachtungen wurden für deep-rough-Mutanten und LPS-Zucker-auxotrophe *E. coli* beschrieben (Irvin et al. 1979; Rottem und Leive 1977). Beide *E. coli*-Mutanten sind nicht fähig, die hydrophilen Seitenketten des LPS zu synthetisieren. In Folge dessen bilden sich Bereiche in der äußeren Membran, die der Doppellipidschicht der Zytoplasmamembran ähnlich sind, was sich auch in einer höheren Fluidität widerspiegelt. Ein Bruch in der äußeren Membran ist dadurch möglich.

Diese These wird durch die Arbeit von Smit et al. (1975) bekräftigt. Die Untersuchungen von deep-rough-Mutanten von *Salmonella typhimurium* ergaben, dass die Synthese von nur sehr kurzen LPS-Seitenketten im Vergleich zum Wildstamm mit einer Erhöhung des Phospholipidgehalts (bis zu 70% mehr als der Wildtyp) der äußeren Membran einherging. Der Phospholipidgehalt der äußeren Membran des Wildtyps war nur für die Bildung einer Lipidmonolayer ausreichend. Der Phospholipidgehalt der Mutanten muss sich dementsprechend auf beide Membranhälften der äu-

ßeren Membran verteilen. Aus diesem Grund brachen die Mutanten sehr leicht in der äußeren Membran. Im Gegensatz dazu war die äußere Membran der Wildtypzellen nur sehr schwer bzw. vereinzelt im Gefrierbruch darstellbar.

Werden diese Fakten bei der Betrachtung der Ergebnisse der Elektronenmikroskopie von *S. multivorans* und der Auswertung der Wachstumsversuche einbezogen, so liegt der Schluss nahe, dass die PceA-positiven Zellen auf Pyruvat/Fumarat (SK7) einen Defekt in der äußeren Membran etablieren, der sich negativ auf die Stabilität dieser Zellen auswirkt. Die in Abbildung 24 gezeigten EM-Aufnahmen lassen die Spekulation zu, dass diese Zellen ein kürzeres LPS besitzen könnten. Auf Pyruvat/Fumarat-gewachsenen Zellen ist die Geißel auf einer Zelle noch sehr gut zu sehen (Abb. 24, A). Bei den Pyruvat/PCE-gewachsenen Zellen hingegen scheint die Geißel in die Oberfläche fast vollständig eingesunken zu sein (Abb. 24, B). Warum aber etablieren PceA⁺-Zellen auf Pyruvat/Fumarat diesen Defekt und PceA⁻-Zellen auf dem selben Medium nicht?

Tat-Mutanten von *E. coli* zeigen pleiotrope Defekte der Zellhülle (Stanley et al. 2001). Diese Mutanten sind nicht mehr in der Lage, sich nach der Zellteilung voneinander zu trennen. Ebenso reagieren diese Zellen hypersensitiv auf hydrophobe Antibiotika sowie auf Lysozym. Zudem "verlieren" sie periplasmatische Enzyme ins Kulturmedium. Diese Phänotypen deuteten auf einen Defekt der äußeren Membran hin. Intensivere Untersuchungen identifizierten zwei Tat-abhängige N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidasen in *E. coli* als Ursache für den Phänotyp der Tat-Mutanten. Eine Überexpression einer Sec-abhängigen Zellwandamidase in den Tat-Mutanten führte zum Wildtypphänotyp, wohingegen eine Überexpression der Tat-abhängigen Amidasen in dieser Tat-Mutante den Zellwanddefekt nicht beheben konnte (Ize et al. 2003, 2004). Die Misslokalisierung von Tat-abhängigen Enzymen in *E. coli* Tat-Mutanten erzeugt also Phänotypen mit Defekten in der Zellhülle.

In den auf Pyruvat/Fumarat-subkultivierten Zellen (SK7) von *S. multivorans* wird die PCE-Dehalogenase weiterhin exprimiert, jedoch nicht ins Periplasma exportiert (Abb. 2, Spur 3). Hier liegt die Vermutung nahe, dass durch die Misslokalisierung der PCE-Dehalogenase auf Pyruvat/Fumarat-Medium die Zellen Defekte in der Zellhülle etablierten, die zum schnellen Absterben führten. Die Kultur ohne exprimiertes Enzym (SK121) verhielt sich im Wachstumsversuch und auch im Gefrierbruch wie ein "normales" Gram-negatives Bakterium, obwohl sie auch auf Pyruvat/Fumarat-

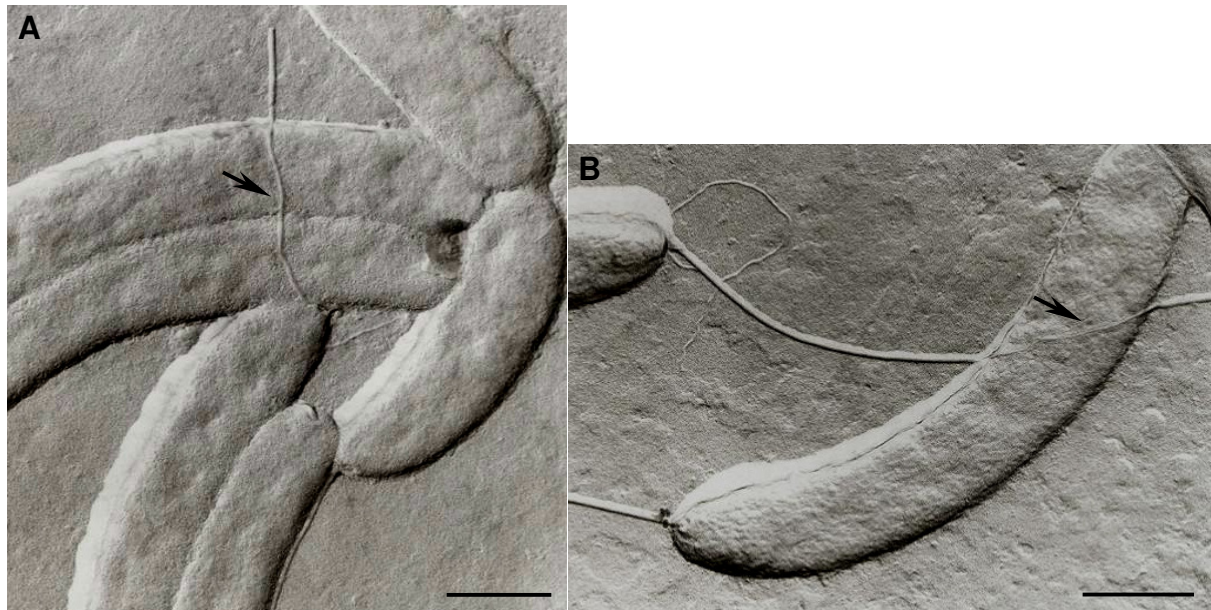


Abb. 24 Oberflächen-Replika von *Sulfurospirillum multivorans*. Es sind Pyruvat/Fumarat SK7 (A) und Pyruvat/PCE SK7 (B) subkultivierte Zellen dargestellt. In den Abbildungen sind Geißeln (Pfeile markieren interessanten Bereich) dargestellt, die über eine benachbarte Zelle verlaufen. Der Maßstab entspricht 500 nm.

Medium kultiviert worden war. Der einzige Unterschied bestand in der An- bzw. Abwesenheit der PCE-Dehalogenase im Organismus.

Für die Verwertung von Pyruvat/Fumarat wird der Tat-Apparat nicht benötigt, da beide Enzyme (Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und die Fumaratreduktase) zytoplasmatisch lokalisiert sind und auch kein Signalpeptid für den Tat-Transport enthalten. Möglicherweise blockiert die PCE-Dehalogenase den Transport anderer Tat-Substrate (z.B. von Enzymen für die Zellwandsynthese). Dieser Effekt konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden. Die Überexpression von Sufl (Tat-Substrat unbekannter Funktion) in *E. coli* führt zu einem verminderten Transport der Trimethylamin-N-Oxid-Reduktase (TorA) ins Periplasma (Ize et al. 2004). Eine Überexpression des Fusionsproteins TorA-GFP (Grün-Fluoreszierendes-Protein) sättigte schon in geringen Konzentrationen den Tat-Apparat. Durch gleichzeitige Überexpression der Komponenten des Tat-Apparats wurden nahezu 100% des überexprimierten Fusionsproteins ins Periplasma exportiert (Barrett et al. 2003).

Da die PCE-Dehalogenase in Pyruvat/Fumarat-Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist (Abb. 5, A), kann sie den Tat-Apparat nicht durch Bindung an TatC (Membranprotein) blockieren, vorausgesetzt, der Tat-Apparat von *E. coli* und *S. multivorans* sind funktionell ähnlich. Der Transport von Tat-Proteinen ins Periplasma könnte durch Bindung Tat-spezifischer Chaperone ebenfalls blockiert werden. Diese sind für *E. coli*

jedoch nur für spezifische Tat-Substrate beschrieben (Hatzixanthis et al. 2005; Oresnik et al. 2001) und somit nicht generell in den Tat-Transport involviert.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse könnten in *S. multivorans* die Proteine des Tat-Apparats direkt in der Substraterkennung sowie im Transport zur Membran involviert sein. In der Literatur sind bisher zwei Tat-Systeme beschrieben, die nach diesem Mechanismus die Proteine ins Periplasma exportieren. Eine direkte Interaktion der Tat-Proteine mit ihrem Substrat im Zytoplasma wurde für die Phosphodiesterase (PhoD) von *Bacillus subtilis* beschrieben. Im *pho*-Operon sind die beiden Gene für den Tat-abhängigen Transport (*tatA_d* und *tatC_d*) von PhoD kodiert. TatA_d war nicht nur in der Membran sondern auch im Zytoplasma nachweisbar (Pop et al. 2003). Die Autoren konnten zeigen, dass TatA_d spezifisch PhoD bindet und an die Membran transportiert, dort TatC_d erkennt und der Export erfolgt. Die Integration von TatA_d in die Membran ist dabei strikt von der vorherigen Bindung des Substrats PhoD abhängig. Ungebundenes TatA_d wird nicht in die Membran integriert (Schreiber et al. 2006).

Ein ähnliches System wie für *B. subtilis* wurde für *Streptomyces lividans* beschrieben. In diesem System konnte gezeigt werden, dass TatA und TatB auch im Zytoplasma vorkommen (De Keersmaecker et al. 2005a). *In vitro*-Studien zeigten, dass TatA und TatB spezifisch verschiedene Tat-Substrate binden konnten, wobei die Affinität zu den Substraten von TatB größer war als die von TatA (De Keersmaecker et al. 2005b). Aufgrund der isolierten Tat-Systeme (TatAC und TatBC) schlossen die Autoren, dass das Tat-System in *S. lividans* funktionell andersartig ist als das in *E. coli*. Sie postulierten die Erkennung des Tat-Substrats im Zytoplasma durch TatA und/oder TatB und den nachfolgenden Transport an das membranintegrale TatC mit anschließendem Export des gebundenen Tat-Proteins.

Werden alle Informationen und die eigenen Ergebnisse zusammengefasst, könnte folgendes Modell für *S. multivorans* gelten:

- Pyruvat/Fumarat-Zellen exprimieren die PCE-Dehalogenase über einen längeren Zeitraum auch in Abwesenheit von PCE.
- Das Enzym liegt in diesen Zellen zytoplasmatisch vor.
- PCE induziert die Translokation ins Periplasma.
- Durch Subkultivierung der Zellen auf Pyruvat/Fumarat (> 30 Kultivierungen) wird die Expression von PceA eingestellt.

- Das Verschwinden der PCE-Dehalogenase bewirkt eine Abnahme des Gehalts des spezifischen Kofaktors Norpseudovitamin-B₁₂ (oder umgekehrt?)
- PceA-positive Zellen sterben auf Pyruvat/Fumarat sehr schnell ab. In Anwesenheit von PCE ist diese schnelle Absterbephase nicht zu beobachten.
- Die Misslokalisierung der PCE-Dehalogenase in Abwesenheit von PCE könnte zu pleiotropen Defekten der Zellhülle führen.
- Zytoplasmatisches PceA könnte an Tat-Chaperonen oder TatA bzw. TatB im Zytoplasma gebunden vorliegen. Dadurch könnte der Transport anderer Tat-Substrate ins Periplasma gehemmt bzw. minimiert werden.
- Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass Zellen ohne exprimiertes PceA stabiler sind: sie verhalten sich im Wachstumsversuch und im Gefrierbruch wie die Zellen mit exprimierter PCE-Dehalogenase in Anwesenheit von PCE.

5. SCHLUSSBEMERKUNGEN

Die PCE-Dehalogenase von *S. multivorans* ist ein Enzym mit einmaligen Eigenschaften. Neben den zwei Eisen-Schwefel-Zentren, die bei den meisten reduktiven Dehalogenasen vorhanden sind, wurde aus diesem Enzym ein neuartiger Kofaktor (Norpseudovitamin-B₁₂) isoliert (Siebert 2002; Kräutler et al. 2003). Die Geschwindigkeit der Dechlorierung von Trichloracetat war für den gereinigten Kofaktor ca. ~50-fach höher als für Cyanocobalamin (Siebert 2002). Das Enzym hat, eventuell aufgrund des andersartigen Corrinoide, die bisher höchste Dechlorierungsaktivität aller bekannten reduktiven Dehalogenasen.

Nur *Desulfitobacterium hafniense* Stamm PCE-S exprimiert neben *S. multivorans* die PCE-Dehalogenase auch in Abwesenheit der chlorierten Substrate (PCE, TCE). Eine strikte Regulation der Expression der Dehalogenase wie bei *Desulfitobacterium dehalogenans* (Smidt et al. 2000; Pop et al. 2004; Smidt und de Vos 2004) kann für *S. multivorans* ausgeschlossen werden. Die Funktionsweise des beteiligten Transkriptionsfaktors in *D. dehalogenans* wurde erst kürzlich beschrieben (Pop et al. 2006). Ein solcher Transkriptionsfaktor fehlt im *pce*-Operon von *S. multivorans*. Da die Regulation der PCE-Dehalogenase scheinbar nicht auf der Ebene der Transkription erfolgt, ist das Fehlen eines spezifischen Transkriptionsfaktors nicht überraschend.

Es konnte gezeigt werden, dass der Organismus auf Pyruvat/Fumarat-Medium in Abwesenheit der Substrate PCE und TCE das Enzym nicht ins Periplasma transportiert, obwohl das Enzym eine Signalsequenz für den Tat-Apparat enthält. Eine direkte oder indirekte Folge des misslokalisierten Tat-Substrats (PceA) scheinen pleiotrope Defekte der Zellhülle zu sein. Die Ursachen könnten unter anderem darin liegen, dass der Organismus i) die Fettsäurezusammensetzung der Membran nicht mehr regulieren kann (Scaravaglio et al. 1993) oder ii) in der LPS-Synthese gestört ist (Smit et al. 1975; Rottem und Leive 1977; Irvin et al. 1979; Armitage 1982). Eine weitere Ursache könnte die Blockade des Tat-Apparats sein (Stanley et al. 2001; Ize et al. 2003, 2004). Dies sind allerdings nur Vermutungen. Die experimentellen Bestätigungen stehen noch aus.

In zukünftigen Arbeiten sollte ein Blick auf die Lipidzusammensetzung sowie den LPS-Gehalt der Zellen in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen geworfen werden.

Die mögliche Blockierung des Tat-Apparats als Ursache für die Defekte in der Zellhülle kann nur in Tat-Mutanten von *S. multivorans* überprüft werden. Ebenso kann die Rolle des zweiten Gens im *pce*-Operon nur in *pceB*-Mutanten studiert werden. Der Mechanismus, wie PCE den Transport des Enzyms initiiert bzw. wie in Abwesenheit von PCE der Transport ins Periplasma verhindert wird, ist ebenfalls von Interesse. Auch dieses Problem lässt sich nur mittels Deletionsmutanten der beteiligten Komponenten lösen.

Dazu ist ein genetisches System für *S. multivorans* unabdingbar. Dessen Etablierung blieb bislang erfolglos. Bisher ist nur ein genetisches System für einen reduktiven Dehalogenierer beschrieben (Smidt et al. 1999, 2001). Folgeliteratur über diesen Organismus, basierend auf Mutationsanalysen, fehlt bis zum heutigen Zeitpunkt und lässt die Funktion des beschriebenen genetischen Systems jedoch fragwürdig erscheinen.

Die transkriptionelle Regulation der PCE-Dehalogenase scheint nur sehr langsam zu erfolgen und mit der Synthese des Kofaktors gekoppelt zu sein. Im Normalfall wird dieses Regulationssystem jedoch nicht benötigt, da der Organismus das Enzym auch in Abwesenheit der Substrate exprimiert.

Warum der Organismus die PCE-Dehalogenase scheinbar "konstitutiv" exprimiert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Werden alle Ergebnisse betrachtet, erscheint dieses Phänomen jedoch nicht sinnvoll. Die Zellen sind in Abwesenheit von PCE oder TCE mit der exprimierten Dehalogenase (auf Pyruvat/Fumarat-Medium) viel fragiler und empfindlicher als Zellen auf dem gleichen Medium ohne exprimierte Dehalogenase. Warum der Organismus die Defekte der Zellhülle dennoch "in Kauf" nimmt und somit sein Überleben in Abwesenheit von PCE/TCE stark eingeschränkt ist, ist eine interessante Frage, die in zukünftigen Arbeiten geklärt werden muss. Andererseits lassen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass PCE und TCE ubiquitär in der Umwelt vorliegen, so dass die in der Pyruvat/Fumarat-Kultur beobachteten Effekte in der Natur nicht auftreten.

6. LITERATUR

- Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with Image J. *Biophotonics International*. 11: 36-42
- Armitage JP (1982) Changes in the organization of the outer membrane of *Proteus mirabilis* during swarming: freeze-fracture structure and membrane fluidity analysis. *J Bacteriol*. 150: 900-904
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, (eds) (1987) Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, Inc., and Wiley, Inc., New York
- Banerjee R, Ragsdale SW (2003) The Many Faces of Vitamin B₁₂: Catalysis by Cobalamin-dependent Enzymes. *Annu Rev Biochem*. 72: 209-247
- Baranov PV, Gesteland RF, Atkins JF (2002) Recoding: translational bifurcations in gene expression. *Gene*. 286: 187-201
- Barrett CM, Ray N, Thomas JD, Robinson C, Bolhuis A (2003) Quantitative export of a reporter protein, GFP, by the twin-arginine translocation pathway in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 304: 279-284
- Berks BC, Sargent F, Palmer T (2000) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol*. 35: 260-274
- Berks BC, Palmer T, Sargent F (2005) Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr Opin Microbiol*. 8: 174-181
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7: 1513-1523
- Blinkova A, Burkart MF, Owens TD, Walker JR (1997) Conservation of the *Escherichia coli* *dnaX* programmed ribosomal frameshift signal in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*. 179: 4438-4442
- Boyer A, Page-BeLanger R, Saucier M, Villemur R, Lepine F, Juteau P, Beaudet R (2003) Purification, cloning and sequencing of an enzyme mediating the reductive dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol from *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. *Biochem J*. 373: 297-303
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254
- Bunge M, Adrian L, Kraus A, Opel M, Lorenz WG, Andreesen JR, Gorisch H, Lechner U (2003) Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium. *Nature*. 421: 357-360

- Christiansen N, Ahring BK (1996) *Desulfitobacterium hafniense* sp. nov., an anaerobic, reductively dechlorinating bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 46: 442-448
- Christiansen N, Ahring BK, Wohlfarth G, Diekert G (1998) Purification and characterization of the 3-chloro-4-hydroxy-phenylacetate reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense*. *FEBS Lett.* 436: 159-162
- Cole JR, Fathepure BZ, Tiedje JM (1995) Tetrachloroethene and 3-chlorobenzoate dechlorination activities are co-induced in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Biodegrad.* 6: 167-172
- Costerton JW, Ingram JM, Cheng KJ (1974) Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriol Rev.* 38: 87-110
- De Keersmaecker S, Van Mellaert L, Schaerlaekens K, Van Dessel W, Vrancken K, Lammertyn E, Anne J, Geukens N (2005a) Structural organization of the twin-arginine translocation system in *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett.* 579: 797-802
- De Keersmaecker S, Van Mellaert L, Lammertyn E, Vrancken K, Anne J, Geukens N (2005b) Functional analysis of TatA and TatB in *Streptomyces lividans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 335: 973-982
- DeWeerd KA, Mandelco L, Tanner RS, Woese CR, Suflita JM (1990) *Desulfomonile tiedjei* gen. nov. and sp. nov., a novel anaerobic, dehalogenating, sulfate-reducing bacterium. *Arch Microbiol.* 154: 23-30
- Dolfing J (2000) Energetics of Anaerobic Degradation Pathways of Chlorinated Aliphatic Compounds. *Microb Ecol.* 40: 2-7
- Fetzner S (1998) Bacterial dehalogenation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 50: 633-657
- Fisher N, Rich PR (2000) A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J Mol Biol.* 296: 1153-1162
- Fujimoto K (1997) SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes: practical procedure, interpretation and application. *Histochem Cell Biol.* 107: 87-96
- Furukawa K, Suyama A, Tsuboi Y, Futagami T, Goto M (2005) Biochemical and molecular characterization of a tetrachloroethene dechlorinating *Desulfitobacterium* sp. strain Y51: a review. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32: 534-541
- Futagami T, Tsuboi Y, Suyama A, Goto M, Furukawa K (2006) Emergence of two types of nondechlorinating variants in the tetrachloroethene-halorespiring *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70: 720-728

- Gabor K, Verissimo CS, Cyran BC, Ter Horst P, Meijer NP, Smidt H, de Vos WM, van der Oost J (2006) Characterization of CprK1, a CRP/FNR-type transcriptional regulator of halorespiration from *Desulfitobacterium hafniense*. J Bacteriol. 188: 2604-2613
- Gerritse J, Renard V, Pedro Gomes TM, Lawson PA, Collins MD, Gottschal JC (1996) *Desulfitobacterium* sp. strain PCE1, an anaerobic bacterium that can grow by reductive dechlorination of tetrachloroethene or *ortho*-chlorinated phenols. Arch Microbiol. 165: 132-140
- Gesteland RF, Atkins JF (1996) Recoding: dynamic reprogramming of translation. Annu Rev Biochem. 65: 741-768
- Gribble GW (1998) Naturally Occurring Organohalogen Compounds. Acc. Chem. Res. 31: 141-152
- Häfner D (2002) Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen flexiblen kationischen Lipidvesikeln und DNS sowie *in vitro* und *in vivo* Eigenschaften der daraus hergestellten Komplexe. Dissertation. München
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 166: 557-580
- Hasin M, Rottem S, Razin S (1975) The outer membrane of *Proteus mirabilis*. I. Isolation and characterization of the outer and cytoplasmic membrane fractions. Biochim Biophys Acta. 375: 381-394
- Hatzixanthis K, Clarke TA, Oubrie A, Richardson DJ, Turner RJ, Sargent F (2005) Signal peptide-chaperone interactions on the twin-arginine protein transport pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 8460-8465
- He J, Ritalahti KM, Aiello MR, Löffler FE (2003a) Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a *Dehalococcoides* species. Appl Environ Microbiol. 69: 996-1003
- He J, Ritalahti KM, Yang KL, Koenigsberg SS, Löffler FE (2003b) Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. Nature. 424: 62-65
- Holliger C, Schraa G, Stams AJ, Zehnder AJ (1993) A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. Appl Environ Microbiol. 59: 2991-2997
- Holliger C, Wohlfarth G, Diekert G (1998a) Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 22: 383-398
- Holliger C, Hahn D, Harmsen H, Ludwig W, Schumacher W, Tindall B, Vazquez F, Weiss N, Zehnder AJ (1998b) *Dehalobacter restrictus* gen. nov. and sp. nov., a strictly anaerobic bacterium that reductively dechlorinates tetra- and trichloroethene in an anaerobic respiration. Arch Microbiol. 169: 313-321

- Holliger C, Regeard C, Diekert G (2003) Dehalogenation by anaerobic bacteria. 115-157. In M. M. Häggblom and I.D. Bossert (ed.), Dehalogenation: microbial process and environmental applications. Kluwer Academic, Boston, Dordrecht, London.
- Hölscher T, Gorisch H, Adrian L (2003) Reductive dehalogenation of chlorobenzene congeners in cell extracts of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. Appl Environ Microbiol. 69: 2999-3001
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene. 96: 23-28
- Irvin RT, Lam J, Costerton JW (1979) Structural and biochemical examination of ghosts derived from a deep rough (heptose-deficient lipopolysaccharide) strain and a smooth strain of *Escherichia coli*. Can J Microbiol. 25: 436-446
- Ize B, Stanley NR, Buchanan G, Palmer T (2003) Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. Mol Microbiol. 48: 1183-1193
- Ize B, Porcelli I, Lucchini S, Hinton JC, Berks BC, Palmer T (2004) Novel phenotypes of *Escherichia coli* tat mutants revealed by global gene expression and phenotypic analysis. J Biol Chem. 279: 47543-47554
- Johansen C, Verheul A, Gram L, Gill T, Abee T (1997) Protamine-induced permeabilization of cell envelopes of gram-positive and gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol. 63: 1155-1159
- John M, Schmitz RP, Westermann M, Richter W, Diekert G (2006) Growth substrate dependent localization of tetrachloroethene reductive dehalogenase in *Sulfurospirillum multivorans*. Arch Microbiol. 21: 21-27
- Jormakka M, Tornroth S, Byrne B, Iwata S (2002) Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. Science. 295: 1863-1868
- Keppler F, Borchers R, Pracht J, Rheinberger S, Scholer HF (2002) Natural formation of vinyl chloride in the terrestrial environment. Environ Sci Technol. 36: 2479-2483
- Kipping M, Lilie H, Lindenstrauss U, Andreesen JR, Griesinger C, Carlomagno T, Brüser T (2003) Structural studies on a twin-arginine signal sequence. FEBS Lett. 550: 18-22
- Krajmalnik-Brown R, Holscher T, Thomson IN, Saunders FM, Ritalahti KM, Löffler FE (2004) Genetic identification of a putative vinyl chloride reductase in *Dehalococcoides* sp. strain BAV1. Appl Environ Microbiol. 70: 6347-6351
- Krauter H (2006) Untersuchungen zur Beteiligung membranständiger redoxaktiver Komponenten bei der Dehalorespiration in *Sulfurospirillum multivorans*. Diplomarbeit. Jena

- Kräutler B, Fieber W, Ostermann S, Fasching M, Ongania KH, Gruber K, Kratky C, Mikl C, Siebert A, Diekert G (2003) The Cofactor of Tetrachloroethene Reductive Dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans* Is Norpseudob₁₂, a New Type of a Natural Corrinoid. *Helv Chim Acta*. 86: 3698-3716
- Kröger A, Geisler V, Lemma E, Theis F, Lenger R (1992) Bacterial fumarate respiration. *Arch Microbiol*. 158: 311-314
- Krumholz LR (1997) *Desulfuromonas chloroethenica* sp. nov. uses tetrachloroethylene and trichloroethylene as electron acceptors. *Int J Syst Evol Microbiol*. 47: 1262-1263
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685
- Leisinger T (1996) Biodegradation of chlorinated aliphatic compounds. *Curr Opin Biotechnol*. 7: 295-300
- Liljeström P, Laamanen I, Palva ET (1988) Structure and expression of the *ompB* operon, the regulatory locus for the outer membrane porin regulon in *Salmonella typhimurium* LT-2. *J Mol Biol*. 201: 663-673
- Louie TM, Ni S, Xun L, Mohn WW (1997) Purification, characterization and gene sequence analysis of a novel cytochrome c co-induced with reductive dechlorination activity in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Arch Microbiol*. 168: 520-527
- Louie TM, Mohn WW (1999) Evidence for a chemiosmotic model of dehalorespiration in *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *J Bacteriol*. 181: 40-46
- Magnuson JK, Stern RV, Gossett JM, Zinder SH, Burris DR (1998) Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl Environ Microbiol*. 64: 1270-1275
- Magnuson JK, Romine MF, Burris DR, Kingsley MT (2000) Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of *tceA* and substrate range characterization. *Appl Environ Microbiol*. 66: 5141-5147
- Maillard J, Schumacher W, Vazquez F, Regeard C, Hagen WR, Holliger C (2003) Characterization of the corrinoid iron-sulfur protein tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalobacter restrictus*. *Appl Environ Microbiol*. 69: 4628-4638
- Maillard J, Regeard C, Holliger C (2005) Isolation and characterization of Tn-Dha1, a transposon containing the tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium hafniense* strain TCE1. *Environ Microbiol*. 7: 107-117
- Meyer HW, Winkelmann H (1969) Die Gefrierätzung und die Struktur biologischer Membranen. *Protoplasma* 68: 253-270
- Miller E, Wohlfarth G, Diekert G (1996) Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans*. *Arch Microbiol*. 166: 379-387

- Miller E, Wohlfarth G, Diekert G (1997) Comparative studies on tetrachloroethene reductive dechlorination mediated by *Desulfitobacterium* sp. strain PCE-S. Arch Microbiol. 168: 513-519
- Miller E, Wohlfarth G, Diekert G (1998) Purification and characterization of the tetrachloroethene reductive dehalogenase of strain PCE-S. Arch Microbiol. 169: 497-502
- Mohn WW, Tiedje JM (1990) Strain DCB-1 conserves energy for growth from reductive dechlorination coupled to formate oxidation. Arch Microbiol. 153: 267-271
- Moor H, Mühlethaler K (1963) Fine structure in frozen-etched yeast cells. J Cell Biol. 17: 609-628
- Morgan JA, Cranwell PA, Pickup RW (1991) Survival of *Aeromonas salmonicida* in lake water. Appl Environ Microbiol. 57: 1777-1782
- Mühlradt PF (1975) Die Zelloberfläche Gram-negativer Bakterien. Biologie in unserer Zeit. 5: 33-40
- Müller JA, Rosner BM, Von Abendroth G, Meshulam-Simon G, McCarty PL, Spormann AM (2004) Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution. Appl Environ Microbiol. 70: 4880-4888
- Neumann A, Scholz-Muramatsu H, Diekert G (1994) Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. Arch Microbiol. 162: 295-301
- Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G (1995) Properties of tetrachloroethene and trichloroethene dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*. Arch Microbiol. 163: 276-281
- Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G (1996) Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. J Biol Chem. 271: 16515-16519
- Neumann A, Wohlfarth G, Diekert G (1998) Tetrachloroethene dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*: cloning, sequencing of the encoding genes, and expression of the *pceA* gene in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 180: 4140-4145
- Neumann A, Siebert A, Trescher T, Reinhardt S, Wohlfarth G, Diekert G (2002) Tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: substrate specificity of the native enzyme and its corrinoid cofactor. Arch Microbiol. 177: 420-426
- Ni S, Fredrickson JK, Xun L (1995) Purification and characterization of a novel 3-chlorobenzoate-reductive dehalogenase from the cytoplasmic membrane of *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. J Bacteriol. 177: 5135-5139

- Nijenhuis I, Zinder SH (2005) Characterization of hydrogenase and reductive dehalogenase activities of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195. *Appl Environ Microbiol.* 71: 1664-1667
- Nonaka H, Keresztes G, Shinoda Y, Ikenaga Y, Abe M, Naito K, Inatomi K, Furukawa K, Inui M, Yukawa H (2006) Complete genome sequence of the dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195. *J Bacteriol.* 188: 2262-2274
- Normark S, Bergstrom S, Edlund T, Grundstrom T, Jaurin B, Lindberg FP, Olsson O (1983) Overlapping genes. *Annu Rev Genet.* 17: 499-525
- Nudler E, Mironov AS (2004) The riboswitch control of bacterial metabolism. *Trends Biochem Sci.* 29: 11-17
- Okeke BC, Chang YC, Hatsu M, Suzuki T, Takamizawa K (2001) Purification, cloning, and sequencing of an enzyme mediating the reductive dechlorination of tetrachloroethylene (PCE) from *Clostridium bifermentans* DPH-1. *Can J Microbiol.* 47: 448-456
- Oppenheim DS, Yanofsky C (1980) Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*. *Genetics.* 95: 785-795
- Oresnik IJ, Ladner CL, Turner RJ (2001) Identification of a twin-arginine leader-binding protein. *Mol Microbiol.* 40: 323-331
- Palmer T, Sargent F, Berks BC (2005) Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol.* 13: 175-180
- Pop OI, Westermann M, Volkmer-Engert R, Schulz D, Lemke C, Schreiber S, Gerlach R, Wetzker R, Müller JP (2003) Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatA_d indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 278: 38428-38436
- Pop SM, Kolarik RJ, Ragsdale SW (2004) Regulation of anaerobic dehalorespiration by the transcriptional activator CprK. *J Biol Chem.* 279: 49910-49918
- Pop SM, Gupta N, Raza AS, Ragsdale SW (2006) Transcriptional activation of dehalorespiration. Identification of redox-active cysteines regulating dimerization and DNA binding. *J Biol Chem.* 281: 26382-26390
- Radu DR, Lai CY, Huang J, Shu X, Lin VS (2005) Fine-tuning the degree of organic functionalization of mesoporous silica nanosphere materials via an interfacially designed co-condensation method. *Chem Commun (Camb).* 1264-1266.
- Richardson D, Sawers G (2002) Structural biology. PMF through the redox loop. *Science.* 295: 1842-1843.

- Roth J, Lawrence J, Bobik T (1996) COBALAMIN (COENZYME B12): Synthesis and Biological Significance. *Annu Rev Microbiol.* 50: 137-181
- Rottem S, Leive L (1977) Effect of variations in lipopolysaccharide on the fluidity of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 252: 2077-2081
- Scaravaglio OR, Farias RN, Massa EM (1993) Starved cells of the fatty acid auxotroph *Escherichia coli* AK7 develop abnormal sensitivity to media with low osmolarity. *Appl Environ Microbiol.* 59: 2760-2762
- Schmitz RPH, Diekert G (2003) Purification and properties of the formate dehydrogenase and characterization of the *fdhA* gene of *Sulfurospirillum multivorans*. *Arch Microbiol.* 180: 394-401
- Schmitz RPH, Diekert G (2004) The *fdh* operon of *Sulfurospirillum multivorans*. *FEMS Microbiol Lett.* 237: 235-242
- Scholz-Muramatsu H, Neumann A, Meßmer M, Moore E, Diekert G (1995) Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch Microbiol.* 163: 48-56
- Schreiber S, Stengel R, Westermann M, Volkmer-Engert R, Pop OI, Muller JP (2006) Affinity of TatCd for TatAd elucidates its receptor function in the *Bacillus subtilis* twin arginine translocation (Tat) translocase system. *J Biol Chem.* 281: 19977-19984
- Schumacher W, Holliger C (1996) The proton/electron ration of the menaquinone-dependent electron transport from dihydrogen to tetrachloroethene in "*Dehalobacter restrictus*". *J Bacteriol.* 178: 2328-2333
- Schumacher W, Holliger C, Zehnder AJ, Hagen WR (1997) Redox chemistry of cobalamin and iron-sulfur cofactors in the tetrachloroethene reductase of *Dehalobacter restrictus*. *FEBS Lett.* 409: 421-425
- Seshadri R, Adrian L, Fouts DE, Eisen JA, Phillippy AM, Methe BA, Ward NL, Nelson WC, Deboy RT, Khouri HM, Kolonay JF, Dodson RJ, Daugherty SC, Brinkac LM, Sullivan SA, Madupu R, Nelson KE, Kang KH, Impraim M, Tran K, Robinson JM, Forberger HA, Fraser CM, Zinder SH, Heidelberg JF (2005) Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*. *Science.* 307: 105-108
- Siebert A (2002) Norpseudovitamin B₁₂: ein neuartiger Corrinoïd-Cofaktor aus der reduktiven PCE-Dehalogenase von *Dehalospirillum multivorans*. Dissertation. Jena
- Siebert A, Neumann A, Schubert T, Diekert G (2002) A non-dechlorinating strain of *Dehalospirillum multivorans*: evidence for a key role of the corrinoïd cofactor in the synthesis of an active tetrachloroethene dehalogenase. *Arch Microbiol.* 178: 443-449
- Smidt H, Song D, van Der Oost J, de Vos WM (1999) Random transposition by Tn916 in *Desulfitobacterium dehalogenans* allows for isolation and characterization of halo-respiration-deficient mutants. *J Bacteriol.* 181: 6882-6888

- Smidt H, van Leest M, van der Oost J, de Vos WM (2000) Transcriptional regulation of the *cpr* gene cluster in *ortho*-chlorophenol-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. J Bacteriol. 182: 5683-5691
- Smidt H, van der Oost J, de Vos WM (2001) Development of a gene cloning and inactivation system for halo-respiring *Desulfitobacterium dehalogenans*. Appl Environ Microbiol. 67: 591-597
- Smidt H, de Vos WM (2004) Anaerobic microbial dehalogenation. Annu Rev Microbiol. 58: 43-73
- Smit J, Kamio Y, Nikaido H (1975) Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: chemical analysis and freeze-fracture studies with lipopolysaccharide mutants. J Bacteriol. 124: 942-958
- Stanley NR, Findlay K, Berks BC, Palmer T (2001) *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. J Bacteriol. 183: 139-144
- Stupperich E, Steiner I, Ruhlemann M (1986) Isolation and analysis of bacterial cobamides by high-performance liquid chromatography. Anal Biochem. 155: 365-370
- Suyama A, Iwakiri R, Kai K, Tokunaga T, Sera N, Furukawa K (2001) Isolation and characterization of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51 capable of efficient dehalogenation of tetrachloroethene and polychloroethanes. Biosci Biotechnol Biochem. 65: 1474-1481
- Suyama A, Yamashita M, Yoshino S, Furukawa K (2002) Molecular characterization of the PceA reductive dehalogenase of *Desulfitobacterium* sp. strain Y51. J Bacteriol. 184: 3419-3425
- Thibodeau J, Gauthier A, Duguay M, Villemur R, Lepine F, Juteau P, Beaudet R (2004) Purification, cloning, and sequencing of a 3,5-dichlorophenol reductive dehalogenase from *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Appl Environ Microbiol. 70: 4532-4537
- Tsukagoshi N, Ezaki S, Uenaka T, Suzuki N, Kurane R (2006) Isolation and transcriptional analysis of novel tetrachloroethene reductive dehalogenase gene from *Desulfitobacterium* sp. strain KBC1. Appl Microbiol Biotechnol. 69: 543-553
- Utkin I, Woese C, Wiegel J (1994) Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. Int J Syst Bacteriol. 44: 612-619
- Utkin I, Dalton DD, Wiegel J (1995) Specificity of reductive dehalogenation of substituted *ortho*-chlorophenols by *Desulfitobacterium dehalogenans* JW/IU-DC1. Appl Environ Microbiol. 61: 346-351
- van de Pas B (2000) Biochemistry and physiology of halo-respiration by *Desulfitobacterium dehalogenans*. Dissertation. Wageningen

- van de Pas BA, Smidt H, Hagen WR, van der Oost J, Schraa G, Stams AJ, de Vos WM (1999) Purification and molecular characterization of ortho-chlorophenol reductive dehalogenase, a key enzyme of halorespiration in *Desulfitobacterium dehalogenans*. J Biol Chem. 274: 20287-20292
- van de Pas BA, Jansen S, Dijkema C, Schraa G, de Vos WM, Stams AJ (2001) Energy yield of respiration on chloroaromatic compounds in *Desulfitobacterium dehalogenans*. Appl Environ Microbiol. 67: 3958-3963
- Vogel T, Criddle C, McCarty P (1987) Transformation of halogenated aliphatic compounds. Environ Sci Technol. 21: 722-736
- Wackett LP, Brusseau GA, Householder SR, Hanson RS (1989) Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. Appl Environ Microbiol. 55: 2960-2964
- Weiss RB (1991) Ribosomal frameshifting, jumping and readthrough. Curr Opin Cell Biol. 3: 1051-1055
- Westermann M, Schlörmann W, John M, Steiniger F, Richter W (2007) Improved antigen retrieval in freeze-fracture cytochemistry by evaporation of carbon as first replication layer. Histochem Cell Biol. 127: 633-639
- Wild A, Hermann R, Leisinger T (1996) Isolation of an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates tetrachloroethene and trichloroethene. Biodegrad. 7: 507-511
- Wohlfarth G, Diekert G (1997) Anaerobic dehalogenases. Curr Opin Biotechnol. 8: 290-295
- Yakhnin H, Babiarz JE, Yakhnin AV, Babitzke P (2001) Expression of the *Bacillus subtilis* *trpEDCFBA* operon is influenced by translational coupling and Rho termination factor. J Bacteriol. 183: 5918-5926
- Zehnder AJ, Wuhrmann K (1976) Titanium (III) citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. Science. 194: 1165-1166
- Zylstra GJ, Wackett LP, Gibson DT (1989) Trichloroethylene degradation by *Escherichia coli* containing the cloned *Pseudomonas putida* F1 toluene dioxygenase genes. Appl Environ Microbiol. 55: 3162-3166

DANKSAGUNG

Ich möchte mich an erster Stelle bei Frau Prof. Dr. G. Diekert für das interessante Thema meiner Dissertation bedanken.

Bei Dr. Roland Schmitz bedanke ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft und das intensive "proof-reading" dieser Arbeit.

Für die interessanten Anregungen für neue Experimente sowie die kritische Betrachtung von Ergebnissen bedanke ich mich bei Frau Dr. Anke Schilhabel.

Für die hervorragende und unkomplizierte Zusammenarbeit zur Durchführung der Elektronenmikroskopie möchte ich mich ganz besonders bei Dr. Martin Westermann und Dr. Walter Richter bedanken (Elektronenmikroskopisches Zentrum, Jena).

Weiterhin geht mein Dank an Dr. Bernhard Schlott für die Übernahme der Proteinsequenzierungen (Fritz-Lipmann-Institut, Jena).

"Last but not least" geht mein Dank an alle Mitarbeiter des Lehrstuhls für "Angewandte und Ökologische Mikrobiologie" für die gute Zusammenarbeit, die mentale und praktische Unterstützung, das tolle Arbeitsklima und die gemeinsame Zeit auch fernab von Labor und Bunsenbrenner.

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Die vorliegende Arbeit habe ich selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt.

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich mich an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Dr. rerum naturalium beworben. Ich habe weder früher noch zur Zeit die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb dieses akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt.

Jena, den 22. Februar 2007

Markus John

CURRICULUM VITAE

Name	Markus John
Geburtsdatum	02.02.1978
Geburtsort	Friedrichroda

Schulbildung

09 / 1984 – 07 / 1988	Grundschule in Behringen
09 / 1988 – 07 / 1991	Erich-Weinert-Oberschule Behringen
08 / 1991 – 06 / 1996	Salza-Gymnasium in Bad Langensalza

Bundeswehr

09 / 1996 – 06 / 1997	Grundwehrdienst 3. Fernmelderegiment 320 in Frankenberg/Eder
-----------------------	---

Studium

10 / 1997 – 09 / 2002	Biologiestudium, FSU-Jena Diplomarbeit am LS für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie "Heterologe Expression des Proteins PceB aus <i>Dehalospirillum multivorans</i> als Fusionsprotein mit dem Maltosebindeprotein (MBP) in <i>E. coli</i> ."
-----------------------	--

Berufliche Tätigkeit

02 / 2001 – 09 / 2001	Nebentätigkeit am MPI für Chemische Ökologie, Jena
10 / 2002 – 04 / 2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter, Doktorand Friedrich-Schiller-Universität Jena Institut für Mikrobiologie LS für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie Dissertation: "Untersuchungen zur Lokalisation und Expression der PCE-Dehalogenase von <i>Sulfurospirillum multivorans</i> ."
seit 05 / 2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter IEP GmbH Wiesbaden

